



Développement d'une méthode innovante pour la génération sécurisée de cellules souches pluripotentes induites par transfert de protéines

Lionel Berthoin

► To cite this version:

Lionel Berthoin. Développement d'une méthode innovante pour la génération sécurisée de cellules souches pluripotentes induites par transfert de protéines. Biotechnologies. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAS014 . tel-01375167

HAL Id: tel-01375167

<https://theses.hal.science/tel-01375167>

Submitted on 3 Oct 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Lionel BERTHOIN

Thèse dirigée par **M. le Professeur Bertrand TOUSSAINT** et
codirigée par **M. le Professeur Frédéric GARBAN**

Préparée au sein du **Laboratoire TIMC-IMAG, équipe TheREx,**
UMR 5525 CNRS/UJF

Dans **l'École Doctorale l'École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la**
Cognition et l'Environnement (EDISCE)

Développement d'une méthode innovante pour la génération sécurisée de cellules souches pluripotentes induites par transfert de protéines

Thèse soutenue publiquement le **Vendredi 2 Octobre 2015**,
devant le jury composé de :

M. le Pr. Bernard LEBLEU

Université Montpellier 2

Président du jury, Rapporteur

M. le Dr. Guy ZUBER

Université de Strasbourg

Rapporteur

Mme le Pr. Hélène LAPILLONNE

Université Pierre-et-Marie-Curie, Paris

Examineur

Mme le Dr. Fabienne BURLINA

Université Pierre-et-Marie-Curie, Paris

Examineur

M. le Dr. Laurent DAVID

Université de Nantes

Examineur

M. le Pr. Bertrand TOUSSAINT

Université Joseph Fourier, Grenoble

Directeur de thèse

M. le Pr. Frédéric GARBAN

Université Joseph Fourier, Grenoble

Co-Directeur de thèse

M. le Dr. David LAURIN

Etablissement Français du Sang, Grenoble

Co-Encadrant



Remerciements

Mes premiers remerciements vont à Monsieur le Professeur Benoît Polack, qui m'a accueilli au sein de l'équipe TheRex depuis mon stage de M2. Merci Benoît pour ton investissement au cours de ce projet et pour nous faire partager aussi bien tes connaissances que tes anecdotes.

Je souhaiterais exprimer toute ma gratitude à Monsieur le Professeur Bertrand Toussaint, qui a dirigé mon projet de thèse, mais aussi de M2. Merci Bertrand pour ta disponibilité, ta gentillesse ainsi que pour ton enthousiasme communicatif, très utile pendant certaines périodes difficiles !! Ce fut un réel plaisir que de travailler avec toi.

Merci à Monsieur le Professeur Frédéric Garban d'avoir co-dirigé ce travail de thèse. Frédéric, je te suis très reconnaissant de m'avoir donné l'opportunité de participer à ce projet si prometteur, ainsi que de nous avoir permis de travailler dans les meilleures conditions possibles.

J'adresse un immense merci (avec une mention toute particulière si tu préfères !) au Docteur David Laurin pour m'avoir encadré (et supporté !) au quotidien pendant plus de trois ans. Je suis vraiment heureux d'avoir pu travailler avec toi, dans les bons et les mauvais moments. Merci pour ta gentillesse et ta grande disponibilité. J'ai beaucoup appris à tes côtés. Par contre j'attends toujours de goûter ton gâteau au chocolat !!

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur Bernard Lebleu et Monsieur le Docteur Guy Zuber, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'à Madame le Professeur Hélène Lapillonne, Madame le Docteur Fabienne Burlina et Monsieur le Docteur Laurent David, d'avoir bien voulu évaluer mes travaux.

Je suis également très reconnaissant envers Monsieur le Professeur Christophe Ribuot, Madame le Docteur Delphine Aldebert ainsi que Monsieur le Professeur Michel Sève de m'avoir donné l'opportunité d'enseigner au sein de l'UFR de Pharmacie.

Merci à Monsieur le Professeur Jean-Luc Lenormand, d'avoir guidé mes premiers pas dans le monde de l'enseignement ... et pour enflammer les soirées TheREx sous le pseudo de DJ J2L !

Merci à Monsieur le Docteur Jean Breton, pour les discussions dans le couloir du 8° et la compagnie le weekend.

Je souhaite également remercier vivement tous les membres de l'équipe TheRex ainsi que les APCuriens pour tous les bons moments partagés ensemble au cours de ces dernières années, qui resteront pour moi inoubliables et remplies de bons souvenirs : **Amandine** (tu as trop de surnoms mais je crois que mon préféré restera Chinatown ! Merci à ma pom-pom girl n°1 !!), **Anne-Laure** (je ne sais pas quoi te dire mis à part de ne surtout pas changer !), **Audrey** (merci de m'avoir encadré pendant mon stage !! Et je tiens à préciser que je n'ai absolument pas participé au lancer de confetti ... !), **Benjamin** (bon courage pour la suite ! A toi

désormais de transmettre le signe ProTiPS aux prochaines générations !!), **Benoit, Bertrand, Cécile, David, DJ J2L, Erwan & Sylvain** (les as du foot), **Hélène** (merci pour ton aide en toute circonstance et ... appelle moi quand tu fais un gâteau !), **Julie B, Julie M, Julien** (il Bastone ou le diot, au choix ... à bientôt pour une partie de pêche !), **Landry** (merci pour ta gentillesse ... et tes précieuses Landrynettes !!), **Marie-Claire** (le gourou de la secte TheRex, encore merci pour les corrections et ton optimisme !), **Mathieu** (merci pour ton soutien pendant la rédaction ! je compte sur toi pour faire résonner Calo au 8e !!), **Muriel, Olivier** (nnnnnoooooonn!), **Pascal, Pauline** (mamie et son thé ... et dire que tu étais ma stagiaire ! Merci à ma pom-pom girl n°2), **Rwanounet** (oh mon dieu !), **Wisia** (je n'oublierais pas ton aide précieuse dans mes recherches d'emploi !) et **Yan**.

Et tous ceux qui sont passés au labo, je ne vous ai pas oubliés : je pense notamment à mes anciens camarades de thèse **Roberta** (tes injures en italien me manquent !!) **Xavier C** (mon pharmacien préféré !) et **Charlotte** (c'était plutôt cool les petits pics qu'on s'envoyait !) mais aussi à **Martin & Fred** alias les Yamanaka's), **Hichem, Dalil, Xavier R, David** (le Dude), **Atanur, Elissar, Emmanuel** ... Et tous ceux que j'ai oublié !

C'est en grande partie grâce à vous si venir au travail a été un bonheur quotidien, j'espère que nous pourrions tous rester en contact !

Mille mercis à mes amis Grenoblois et d'ailleurs, pour tous les moments que nous avons partagés, tous les fous rires, les voyages, et les actions (et les plans foireux !) dont on a le secret ! Un grand merci à **Amélie, Cico, Gaby, Guillaume, Jimmy, Julie, Karim, Momo, Pauline, Pierro, Raouf, les Lyonnaises** et à tous les autres !!!

Enfin, je remercie infiniment mes parents, qui m'ont toujours soutenu dans mes études comme dans mes projets et grâce à qui j'ai pu faire ce petit bout de chemin !

Table des matières

Tables des illustrations	11
Abréviations	15
INTRODUCTION	19
CHAPITRE 1 Cellules souches pluripotentes	20
I. Définition de la pluripotence	21
II. Cellules souches embryonnaires ES	21
III. Reprogrammation cellulaire	23
1. Génération de cellules pluripotentes par transfert nucléaire	24
2. Génération de cellules pluripotentes par fusion cellulaire	27
3. Cellules souches pluripotentes induites (iPS)	28
i. Concept	28
ii. Etat de l'art	29
4. iPS <i>versus</i> Cellules ES	30
i. Potentiel de différenciation	31
a. Concept de mémoire épigénétique des iPS	31
b. Persistance de l'expression des transgènes	31
ii. Intégrité génomique et stabilité du caryotype	32
iii. Evaluation de la sécurité <i>in vivo</i>	32
IV. Applications des cellules souches pluripotentes	34
1. Modèles d'études en biologie fondamentale et appliquée	35
i. Tests toxicologiques	35
ii. Modèles pathologiques et criblages de molécules thérapeutiques	35
2. Médecine régénérative	37
i. Applications cliniques des cellules ES	38
ii. Applications cliniques des iPS	39
a. Preuve de concept chez l'animal	39
b. Premier essai clinique utilisant des iPS	40
V. Limites des cellules pluripotentes et problèmes soulevés	41
CHAPITRE 2 Aspects moléculaires de la pluripotence	43
I. Régulation transcriptionnelle	45
1. Oct4	47
2. Sox2	48
3. Nanog	49
4. Klf4	51
5. c-Myc	52
6. Lin28a	54
II. Régulation épigénétique	58
1. Marques épigénétiques des histones	59
i. Méthylation	59
ii. Acétylation	59
2. Marques épigénétiques de l'ADN	60
3. Importance de l'épigénétique dans le maintien de la pluripotence	61
i. Myc est un acteur majeur des modifications épigénétiques propres aux cellules ES	61
a. Myc dicte les capacités de prolifération des cellules ES	61

b.	Inhibition de la différenciation des cellules	61
c.	Maintien du réseau transcriptionnel de pluripotence	62
ii.	Les facteurs centraux OSN sont également impliqués dans la mise en place de marques épigénétiques	62
CHAPITRE 3 Génération d'iPS		63
I.	Les grands mécanismes du processus de reprogrammation cellulaire par induction	65
1.	La phase d'initiation stochastique	67
2.	Phase de maturation	68
3.	Phase de stabilisation	69
II.	Différentes méthodes de génération d'iPS	69
1.	Différents systèmes de reprogrammation	70
i.	Reprogrammation par transfert d'acides nucléiques	70
a.	Les vecteurs intégratifs	70
b.	Les vecteurs non intégratifs	78
c.	Reprogrammation par transfert d'ARN	82
ii.	Reprogrammation par transfert de protéines	84
a.	Utilisation des CPP comme vecteurs de facteurs de reprogrammation	85
b.	Autres méthodes de vectorisation de protéines pour la reprogrammation	88
iii.	Synthèse sur les systèmes de reprogrammation	89
2.	Choix de la source de cellules	90
3.	Différentes combinaisons de facteurs de transcription	91
4.	Optimisation du processus de reprogrammation	93
i.	Molécules favorisant la reprogrammation	93
a.	Modulation épigénétique	93
b.	Modulation des voies de signalisation cellulaire	94
c.	Génération d'iPS sans facteurs de transcription exogènes	95
ii.	Conditions de culture	96
III.	Caractérisation de la pluripotence	98
i.	Caractérisation <i>in vivo</i>	99
a.	Formation de tératomes <i>in vivo</i>	99
b.	Transmission germinale	99
ii.	Caractérisation <i>in vitro</i>	100
a.	Analyse morphologique	100
b.	Expression de gènes et marqueurs spécifiques de pluripotence	100
c.	Formation de corps embryoïdes <i>in vitro</i>	101
d.	Analyse du profil épigénétique	101
CHAPITRE 4 Développement d'un vecteur non intégratif innovant pour la génération sécurisée d'iPS		102
I.	Objectif du projet	103
II.	Les vecteurs de protéines de l'équipe TheREx	104
1.	Domaine minimal MD11 du virus d'Epstein-Barr	104
i.	Généralités	104
ii.	Caractérisations de la séquence minimale de pénétration cellulaire MD11	105
iii.	Mécanisme de pénétration cellulaire	106
iv.	Applications	107
2.	Dodécaèdre de l'adénovirus de type 3	108
i.	Généralités	108
ii.	Caractéristiques du Dd de l'Ad3	110
iii.	Utilisation du Dd de l'Ad3 comme vecteur de protéines	110
iv.	Applications développées à partir du Dd	112

3.	Système de sécrétion de type 3 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	114
i.	Généralités sur la bactérie	114
ii.	Fonctionnement du SST3	117
a.	Les régulateurs transcriptionnels du SST3	119
b.	Les protéines du complexe de sécrétion	119
c.	Les protéines du complexe de translocation	120
d.	Les effecteurs du SST3	120
e.	Les chaperones translocatrices	121
iii.	Ingénierie du SST3 pour la vectorisation de protéines d'intérêt	121
a.	Génération d'une souche de <i>P. aeruginosa</i> atténuée	121
b.	Génération d'un plasmide d'expression spécifique	122
c.	Contrôle du SST3 et translocation de protéines d'intérêt grâce au plasmide pEAI	123
d.	Applications	126
e.	Atténuation de la virulence de la bactérie par traitement photochimique	128
III.	Cellules à reprogrammer	131
1.	Cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon	132
i.	Caractéristiques et obtention	132
ii.	Intérêts de la reprogrammation à partir de CSH de sang de cordon	133
2.	Fibroblastes	135
i.	Caractéristiques et obtention	135
ii.	Intérêts de la reprogrammation à partir de fibroblastes	136
IV.	Démarche scientifique	136

MATERIELS ET METHODES 139

I.	Plasmides et souches	140
1.	Génération des plasmides recombinants	140
i.	Obtention des séquences codantes d'intérêt	140
ii.	Clonage	141
iii.	Extraction et purification des plasmides	142
2.	Génération des souches de <i>P. aeruginosa</i>	143
i.	Transformation par électroporation	143
ii.	Sélection et amplification	144
3.	Génération des souches d'expression d' <i>E. Coli</i>	144
II.	Expression, purification et caractérisation des protéines recombinantes	144
1.	Production et sécrétion de protéines recombinantes par <i>P. aeruginosa</i>	144
i.	Sécrétion de protéines recombinantes via le SST3 de <i>P. aeruginosa</i>	144
ii.	Précipitation des protéines du surnageant à l'acide trichloroacétique	145
2.	Expression de protéines recombinantes chez <i>E.coli</i> et purification	145
i.	Conditions d'expression	145
ii.	Purification des facteurs de transcription et protéines associées par chromatographie d'affinité	146
iii.	Resolubilisation de la bêta-lactamase et protéines associées produites en corps d'inclusion	147
iv.	Purification de la bêta-lactamase et protéines associées après solubilisation par chromatographie d'affinité	147
3.	Caractérisation des protéines recombinantes	148
i.	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	148
ii.	Western Blot	148
iii.	Dosage des protéines	149
iv.	Activité bêta-lactamase des protéines rapportrices	149

v.	Test d'affinité des protéines Oct4 sur leur séquence nucléotidique cible (TransAM® Oct-4)	149
III.	Cellules de mammifères	150
1.	Fibroblastes embryonnaires de souris	150
i.	Obtention	150
ii.	Utilisation des MEF comme support des iPS	151
a.	"Coating" des plaques de culture	151
b.	Irradiation et mise en culture des MEF	151
2.	Lignées cellulaires	151
3.	Cellules souches hématopoïétiques CD34 ⁺ de sang de cordon	151
i.	Obtention des sangs de cordon	151
ii.	Isolement des cellules mononuclées	152
iii.	Purification des cellules CD34 ⁺ par tri magnétique	152
iv.	Conditions de culture des cellules CD34 ⁺ de sang de cordons	152
4.	Cellules souches pluripotentes induites	153
IV.	Protocoles de vectorisation	153
1.	SST3 de <i>P. aeruginosa</i>	153
i.	Injection <i>in vitro</i>	153
ii.	Traitement photochimique d'atténuation des bactéries KBMA	154
iii.	Bactéries prêtes à injecter : congélation et décongélation	154
iv.	Remise en culture des cellules eucaryotes injectées	154
v.	Préparation des cellules pour l'analyse de l'efficacité d'injection	155
2.	Zebra MD11	155
3.	Dodécaèdre de l'adénovirus de type 3	155
V.	Analyses cellulaires	155
1.	Efficacité de vectorisation	155
i.	Bêta-lactamase	156
a.	Analyse de l'activité	156
b.	Contrôle inhibiteur de l'activité	156
c.	Immunomarquage	156
ii.	GFP	157
iii.	Immunomarquage du Dodécaèdre	157
2.	Viabilité	157
3.	Variations de l'expression génique	158
i.	Extraction des ARN totaux	158
ii.	Transcription inverse (RT-PCR)	158
iii.	PCR quantitative en temps réel (qPCR)	158
a.	Listes des amorces et cibles	158
b.	Mélange réactionnel et programme	159
c.	Appareil et analyse	159
4.	Microscopie confocale	160
i.	Préparation des échantillons	160
ii.	Analyse	161
5.	Analyses phénotypiques	161
i.	Cytométrie en flux	161
a.	Cytomètre et logiciel	161
b.	Liste des anticorps couplés pour la cytométrie	161
c.	Marquages membranaires et intracellulaires directs	162
ii.	Marquage de l'activité Phosphatase Alcaline	162
VI.	Reprogrammation	163
1.	Protocoles de reprogrammation par le SST3 de <i>P. aeruginosa</i>	163

2.	Protocole de reprogrammation par le virus Sendai	164
i.	Fibroblastes BJ	164
ii.	CD34 ⁺ de sang de cordon	164
RESULTATS		166
CHAPITRE 1 Développement et comparaison des vecteurs protéiques pour la reprogrammation cellulaire		169
I.	Production et purification des vecteurs et facteurs de transcription	171
1.	Présentations des plasmides et souches d'expression	171
i.	<i>P. aeruginosa</i> et plasmide pEAi	171
ii.	<i>E. coli</i> et plasmide pET15b	172
2.	Biologie moléculaire : obtention des différentes constructions et souches	172
i.	Constructions avec le plasmide pET15b	173
ii.	Constructions avec le plasmide pEAi	173
3.	Production des facteurs de transcription chez <i>E.coli</i> et purification	176
i.	Détermination des conditions de production optimales par <i>E. coli</i>	176
ii.	Purification des facteurs de transcription non couplés	178
iii.	Purification des facteurs de transcription couplés au domaine minimal MD11 de la protéine Zebra et au domaine WW3 de l'ubiquitine-ligase Nedd4	180
4.	Production et translocation par le SST3 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	182
II.	Analyse de l'influence des séquences de vectorisation sur l'affinité des facteurs de transcription pour leur séquence cible	184
III.	Comparaison des efficacités de transport dans les cellules cibles des différents vecteurs	187
1.	La bêta-lactamase et la GFP comme outils de comparaison	187
2.	Efficacité de transport par le SST3 de <i>P. aeruginosa</i>	188
i.	Translocation d'ExoS54-Bla via le SST3	188
ii.	Preuve de concept de la vectorisation intracellulaire <i>in vitro</i> d'ExoS54-Bla via le SST3	189
iii.	Translocation de protéines d'intérêt par le SST3 au sein de CSH de sang de cordon et de fibroblastes	191
a.	Injection de CSH CD34 ⁺ de sang de cordon	191
b.	Optimisation des conditions de translocation <i>in vitro</i>	193
c.	Injection de fibroblastes humains	194
3.	Domaine minimal de transduction MD11 et domaine adaptateur WW3 pour l'interaction avec le Dd 195	
i.	Production et purification de Bla seule et associée aux séquences MD11 et WW3	195
ii.	Analyse de l'activité Bla des différentes constructions	197
iii.	Efficacité de vectorisation du dodécaèdre de l'adénovirus de type 3	198
iv.	Efficacité de vectorisation du domaine minimal MD11 de la protéine Zebra	202
IV.	Sélection du vecteur à développer pour la reprogrammation cellulaire	203
1.	Production et purification	204
2.	Protocole de production et influence sur les facteurs de transcription	205
3.	Choix et Perspectives	205
CHAPITRE 2 Vectorisation de facteurs de transcription embryonnaires par le SST3 de <i>P. aeruginosa</i>		207
I.	Translocation des différents facteurs de transcription via le SST3	209
II.	Preuve de concept de l'injection des FT dans les cellules cibles	211
1.	Les facteurs injectés sont adressés au noyau	211
2.	Les facteurs injectés sont actifs	214
CHAPITRE 3 Optimisation des conditions de vectorisation par le SST3		217
I.	Sécurisation du procédé : OST ou OST-ΔuvrAB ?	219

1.	Paramètre n°1 : Toxicité	220
i.	Influence du traitement photochimique atténuateur KBMA sur la cytotoxicité induite par <i>P. aeruginosa</i>	220
ii.	La toxicité est liée à la protéine injectée	222
2.	Paramètre n°2 : Efficacité de vectorisation	224
3.	Paramètre n°3 : Activité transcriptionnelle	227
4.	Elimination de la bactérie après injection des facteurs de transcription	229
II.	Choix de la combinaison de facteurs de transcription	231
III.	Standardisation du procédé : mise au point d'un protocole de congélation de bactéries prêtes à injecter	233
IV.	Perspectives pour la reprogrammation cellulaire	236
CHAPITRE 4 Génération sécurisée d'iPS à partir de CSH et de fibroblastes		237
I.	Contrôle : Génération d'iPS grâce à un vecteur dérivé du SeV	239
1.	Contrôle de vectorisation et d'expression du SeV au sein de CSH et de fibroblastes	240
2.	Reprogrammation par le virus Sev	242
II.	Essai de reprogrammation par le SST3	245
1.	Fibroblastes	245
2.	CSH de sang de cordon	247
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		250
I.	Discussion générale	251
II.	Perspectives	253
1.	Pistes d'optimisation	253
i.	Immunité innée et reprogrammation	253
ii.	Quorum Sensing	254
2.	Perspectives d'applications	255
i.	Mise en application à la génération sécurisée d'iPS	255
ii.	Transdifférenciation	256
Références bibliographiques		259

Tables des illustrations

Index des figures

Figure 1. Aperçu du développement embryonnaire humain et de la hiérarchie au sein des cellules souches.	22
Figure 2. Les faits marquants de l'histoire de la reprogrammation cellulaire.	24
Figure 3. Aperçu des différentes méthodes de reprogrammation cellulaire.	26
Figure 4. Aperçu des applications potentielles des iPS en recherche et en clinique.	35
Figure 5. Représentation des acteurs majeurs de la régulation transcriptionnelle chez les cellules souches embryonnaires.	46
Figure 6. Schéma simplifié des interactions entre les différents acteurs du maintien de la pluripotence et de l'auto-renouvellement des cellules ES.	57
Figure 7. Evolution des marques épigénétiques principales au cours de l'embryogénèse.	58
Figure 8. Aperçu des différentes phases de la reprogrammation.	66
Figure 9. Représentation de l'évolution des vecteurs intégratifs pour la reprogrammation cellulaire.	73
Figure 10. Facilité de reprogrammation et accessibilité des principaux types cellulaires utilisés en reprogrammation (González et al., 2011).	91
Figure 11. Représentation schématisée de la séquence protéique de la Zebra.	105
Figure 12. Représentation schématisées des structures de l'adénovirus (a) et des dodécaèdres fibre (b) et base (c)	109
Figure 13. Interaction entre le Dd et les domaines WW des ubiquitine-ligases.	112
Figure 14. Aperçu de la structure et du fonctionnement du SST3 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . (Hauser, 2009).	118
Figure 15. Représentation schématisée d'ExoS et séquence peptidique d'ExoS54.	122
Figure 16. Carte du plasmide pEAI3S54.	123
Figure 17. Contrôle du SST3 et translocation de protéines recombinantes via le SST3 de <i>P. aeruginosa</i> .	125
Figure 18. Principe et efficacité du traitement photochimique atténuateur KBMA (Le Gouëllec et al., 2013).	129
Figure 19. Aperçu général du projet collaboratif TIMC-TheREx/EFS de génération d'iPS par une reprogrammation protéique innovante et différenciation en CSH et érythrocytes pour des applications en hématologie.	131
Figure 20. Schéma simplifié de l'hématopoïèse (Robb, 2007).	132
Figure 21. Représentation de l'isolement d'un anneau mono-lymphocytaire sur gradient de Ficoll.	152
Figure 22. Protocoles de reprogrammation de CSH de sang de cordon (A) et de fibroblastes dermiques néonataux (B).	163
Figure 23. Stratégie de clonage de Bla en association avec les différentes séquences de vectorisation eu sein du pEAI et du pET15b.	174
Figure 24. Stratégie de clonage des facteurs Oct4 et Sox2 en association avec les différentes séquences de vectorisation eu sein du pEAI (A) et du pET15b (B).	175
Figure 25. Optimisation de l'expression des facteurs de transcription en système <i>E. coli</i> .	178
Figure 26. Purification par chromatographie d'affinité des facteurs Oct4 et Sox2.	180
Figure 27. Purification par chromatographie d'affinité des facteurs Oct4 couplé à MD11 et WW3 et Sox2 couplé à MD11.	181
Figure 28. Test de sécrétion des facteurs Oct4 et Sox2 par le SST3.	184

Figure 29. Principe du kit Active Motif TransAM® Oct-4.	185
Figure 30. Influence des séquences de vectorisation sur l'affinité d'Oct4 pour sa séquence d'ADN cible.	186
Figure 31. Principe du CCF2-AM pour la détection de l'activité bêta-lactamase.	188
Figure 32. Test de sécrétion de la bêta-lactamase par la souche OST.	189
Figure 33. Injection d'ExoS54-Bla par le SST3 dans la lignée K562.	190
Figure 34. Analyse visuelle de l'injection d'ExoS54-Bla dans la lignée K562 par microscopie en fluorescence.	191
Figure 35. Optimisation des conditions de translocation de protéines via le SST3 dans les CD34+ de sang de cordon.	192
Figure 36. Analyse de l'injection d'ExoS54-Bla au sein de fibroblastes BJ par le SST3 de <i>P. aeruginosa</i> .	195
Figure 37. Purification par chromatographie d'affinité des différentes protéines fusion contenant Bla.	197
Figure 38. Analyse de l'influence des domaines WW3 (A) et MD11 (B) sur l'activité de Bla.	198
Figure 39. Evaluation de l'efficacité du transport intracellulaire de protéines recombinantes par le DF au sein de CSH.	201
Figure 40. Evaluation de l'efficacité du transport intracellulaire de protéines recombinantes par MD11 au sein de CSH.	202
Figure 41. Sécrétion des six facteurs de reprogrammation par le SST3 de <i>P. aeruginosa</i> .	210
Figure 42. Analyse par microscopie confocale de la localisation des facteurs de transcription injectés via le SST3 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> au sein de fibroblastes BJ.	212
Figure 43. Variations de l'expression de gènes de pluripotence après injections des facteurs de transcription via le SST3 au sein de fibroblastes BJ.	214
Figure 44. Différences d'induction de l'expression de gènes de pluripotence entre fibroblastes BJ et CSH de sang de cordon après injection des facteurs de transcription via le SST3.	216
Figure 45. Analyse de l'apport de la technologie KBMA sur la réduction de la toxicité liée à la translocation de protéines via le SST3 au sein de fibroblastes BJ.	221
Figure 46. Influence de la protéine injectée sur la toxicité du processus de translocation par le SST3.	223
Figure 47. Analyse par microscopie optique des fibroblastes BJ après injection de différentes protéines via le SST3.	223
Figure 48. Estimation de la proportion de cellules injectées parmi les cellules vivantes.	224
Figure 49. Influence du traitement photochimique KBMA sur la translocation de protéines recombinantes par le SST3 au sein de fibroblastes BJ.	226
Figure 50. Influence du traitement photochimique KBMA sur l'activation transcriptionnelle des gènes de pluripotence induite par le SST3 au sein de fibroblastes BJ.	227
Figure 51. Analyse de l'efficacité du traitement antibiotique dans l'élimination de <i>P. aeruginosa</i> des cultures de fibroblastes BJ.	230
Figure 52. Induction transcriptionnelle des gènes de pluripotence par différentes combinaisons de facteurs de transcriptions vectorisés via le SST3.	233
Figure 53. Influence de la congélation de <i>P. aeruginosa</i> sur la translocation de protéines par le SST3 au sein de fibroblastes BJ.	235
Figure 54. Analyse de l'expression de la GFP au sein de CSH (A) et de fibroblastes BJ (B) après vectorisation de la séquence nucléotidique codante par le virus SeV.	241
Figure 55. Génération d'iPS par un vecteur dérivé du virus SeV.	243

Index des tableaux

<i>Tableau 1. Quelques exemples de modèles de pathologies générés grâce aux iPS ainsi que les tests de candidats médicaments réalisés.</i>	36
<i>Tableau 2. Liste des essais cliniques de thérapie cellulaire réalisés à partir de cellules dérivées de cellules ES.</i>	38
<i>Tableau 3. Utilisation de cellules dérivées d'iPS en thérapie cellulaire régénérative chez l'animal.</i>	40
<i>Tableau 4. Aperçu des marques épigénétiques principales retrouvées au sein des cellules ES et cellules somatiques.</i>	60
<i>Tableau 5. Caractéristiques des principaux vecteurs intégratifs pour la reprogrammation cellulaire.</i>	71
<i>Tableau 6. Principales caractéristiques de quelques CPP parmi les plus étudiés.</i>	85
<i>Tableau 7. Aperçu des différents protocoles de génération d'iPS par transfert de protéines.</i>	87
<i>Tableau 8. Caractéristiques de principaux systèmes de reprogrammation cellulaire.</i>	89
<i>Tableau 9. Liste des principales molécules de modulation épigénétique utilisées pour la reprogrammation.</i>	94
<i>Tableau 10. Principaux tests utilisés pour la caractérisation des cellules ES et des iPS humaines.</i>	98
<i>Tableau 11. Principaux facteurs de virulence de Pseudomonas aeruginosa</i>	115
<i>Tableau 12. Liste des amorces utilisées pour les réactions de PCR. Les séquences complémentaires aux ADNc cibles sont en lettres majuscules, les sites de restriction sont soulignés.</i>	140
<i>Tableau 13. Références et caractéristiques des différentes séquences nucléotidiques et protéines d'intérêt.</i>	141
<i>Tableau 14. Liste des plasmides utilisés au cours du projet.</i>	142
<i>Tableau 15. Liste des souches de P. aeruginosa utilisées</i>	143
<i>Tableau 16. Liste des anticorps utilisés en Western Blot.</i>	148
<i>Tableau 17. Liste des amorces utilisées pour les réactions de PCR quantitative en temps réel.</i>	159
<i>Tableau 18. Liste des anticorps couplés utilisés en cytométrie en flux.</i>	161
<i>Tableau 19. Caractéristiques physicochimiques des protéines exprimées à l'aide des différents vecteurs</i>	176
<i>Tableau 20. Avantages et inconvénients des différents vecteurs évalués comme outils de reprogrammation cellulaire.</i>	204
<i>Tableau 21. Liste des essais de reprogrammation réalisés avec le SST3 sur des fibroblastes dermiques néonataux.</i>	245
<i>Tableau 22. Liste des essais de reprogrammation réalisés avec le SST3 sur des CSH de sang de cordon.</i>	247

Abréviations

7-AAD : 7-Aminoactinomycine D

Ad : Adénovirus

Ad3 : Adénovirus de type 3

ADNc : ADN complémentaire

AP : phosphatase alcaline

BJ : lignée de HNDF

Bla : Bêta-lactamase

CCF2-AM ou CCF2 : substrat fluorigène de Bla

Cellule ES : cellules souche embryonnaire

CFU : Colony-Forming Unit (unité formant colonie)

CHA : souche générée à partir d'un isolat clinique de *P. aeruginosa*

CNV : Copy Number Variation (variation du nombre de copies d'un gène)

CPP : Cell-Penetrating Peptide (Peptide de pénétration cellulaire)

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

DB : Dodécaèdre Base

Dd : Dodécaèdre

DF : Dodécaèdre Fibre

DNMT : DNA Methyltransferase (ADN Méthyltransférase)

DO : densité optique

DO_{600nm} : densité optique à 600 nm

E. coli : Bactérie gram-négative *Escherichia coli*

EBV : virus d'Epstein-Barr

EMT : Transition Epithélio-Mésenchymateuse

ExoS : Exoenzyme S de *P. aeruginosa*

ExoS54 : 54 premiers acides aminés d'ExoS

ExoT : Exoenzyme T de *P. aeruginosa*

ExoU : Exoenzyme U de *P. aeruginosa*

ExoY : Exoenzyme Y de *P. aeruginosa*

HAT : Histone acétyltransférase

HDAC : Histone déacétylase

HNDF : Human Newborn Dermal Fibroblasts (fibroblastes dermiques humains de nouveau-né)

HIV : Human Immunodeficiency Virus (Virus de l'Immunodéficience Humaine)

HMT : Histone méthyltransférases

iPS : induced Pluripotent Stem cell (cellule souche pluripotente induite)

IRES : Internal Ribosome Entry Site

ITR: Inverted Terminal Repeat (séquence terminale répétée inversée)

KBMA : Killed But Metabolically Active (morte mais métaboliquement active)

Klf4 : Kruppel-Like Factor 4

KOSR : KnockOut Serum Replacement

Lin28a : Lin-28 Homolog A

LPS : Lipopolysaccharide

LTR: Long Terminal Repeat (séquence terminale longue répétée)

MCS : Multiple Cloning Site (site de clonage multiple)

MD11 : Domaine Minimal 11 de la protéine Zebra du virus EBV

MEF : Mouse Embryonic Fibroblast (fibroblaste embryonnaire de souris)

MET : Transition Mésenchymo-Epithéliale

MFI : Mean Fluorescence Intensity (intensité moyenne de fluorescence)

MOI : Multiplicity of Infection (multiplicité d'infection)

Nedd4 : Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4

NF- κ B : Nuclear Factor-kappa B

NLR : NOD-Like Receptor

NLR : NOD-Like Receptor

Nt : nucléotide

Oct4 : Octamer-binding transcription factor 4

OST : souche obtenue à partir de la souche CHA par délétion des gènes codant ExoS et ExoT

Ova : partie c-terminale (D248-A376) de l'Ovalbumine

P. aeruginosa : Bactérie gram-négative *Pseudomonas aeruginosa*

PBS : Phosphate-Buffered Saline

PIA : Pseudomonas Isolation Agar

PTD : Protein Transduction Domain (peptide de transduction)

QS : Quorum Sensing

SeV : Virus Sendai

Sox2 : SRY (sex determining region Y)-box 2

SST3 : Système de sécrétion de type 3 de *P. aeruginosa*

SVF : Sérum de Vœu Fœtal

TGF- β : Transforming growth factor beta

TLR : Toll-Like Receptor

UTR : Untranslated Region (region non traduite)

VLP : Virus-Like Particle (particule pseudo-virale)

VPA : Valproic Acid (acide valproïque)

WW3 : domaine WW3 de Nedd4

INTRODUCTION

CHAPITRE 1

Cellules souches pluripotentes

I. Définition de la pluripotence

La pluripotence est la capacité d'une cellule à générer tous les tissus d'un organisme. La cellule souche pluripotente est caractérisée par sa capacité à s'auto-renouveler en théorie indéfiniment, tout en conservant sa capacité à se différencier en tous les types cellulaires d'un organisme. (Thomson and Marshall, 1998 ; Thomson *et al.*, 1995).

II. Cellules souches embryonnaires ES

Les cellules souches embryonnaires ou ES (pour "Embryonic Stem cells"), sont des cellules pluripotentes et se situent en deuxième position dans la hiérarchie des cellules souches, juste en dessous du zygote, qui est la seule cellule souche totipotente, c'est-à-dire capable de générer tissus embryonnaires et extra-embryonnaires (Figure 1).

La cellule ES peut être isolée chez les mammifères à partir du blastocyste primaire dès le quatrième ou cinquième jour du développement embryonnaire, chez la souris et l'homme, respectivement. Ces cellules sont localisées dans la masse cellulaire interne du blastocyste. Elles ont été isolées et cultivées *in vitro* pour la première fois à partir d'embryons murins en 1981 par Evans et Kaufman (Evans and Kaufman, 1981) et d'embryons humains par Thomson et ses collaborateurs en 1998 (Thomson, 1998).

Les cellules souches pluripotentes vont pouvoir se différencier en endoderme, mésoderme et ectoderme, soit les trois feuillets embryonnaires, évoluant vers la formation des cellules spécialisées constituant un organisme. Nous retrouvons ensuite les cellules multipotentes, déjà engagées dans une voie de différenciation tissulaire, telles que les cellules souches hématopoïétiques, capables de se différencier en n'importe quelle cellule sanguine, les cellules souches neuronales capables de se différencier en cellules du système nerveux comme les neurones, astrocytes et oligodendrocytes ou encore les cellules souches cardiaques capables de générer de nouveaux cardiomyocytes. Enfin, encore plus différenciées, nous retrouvons cellules matures et spécialisées, assurant des fonctions particulières, telles que les neurones, les hépatocytes ou encore les lymphocytes.

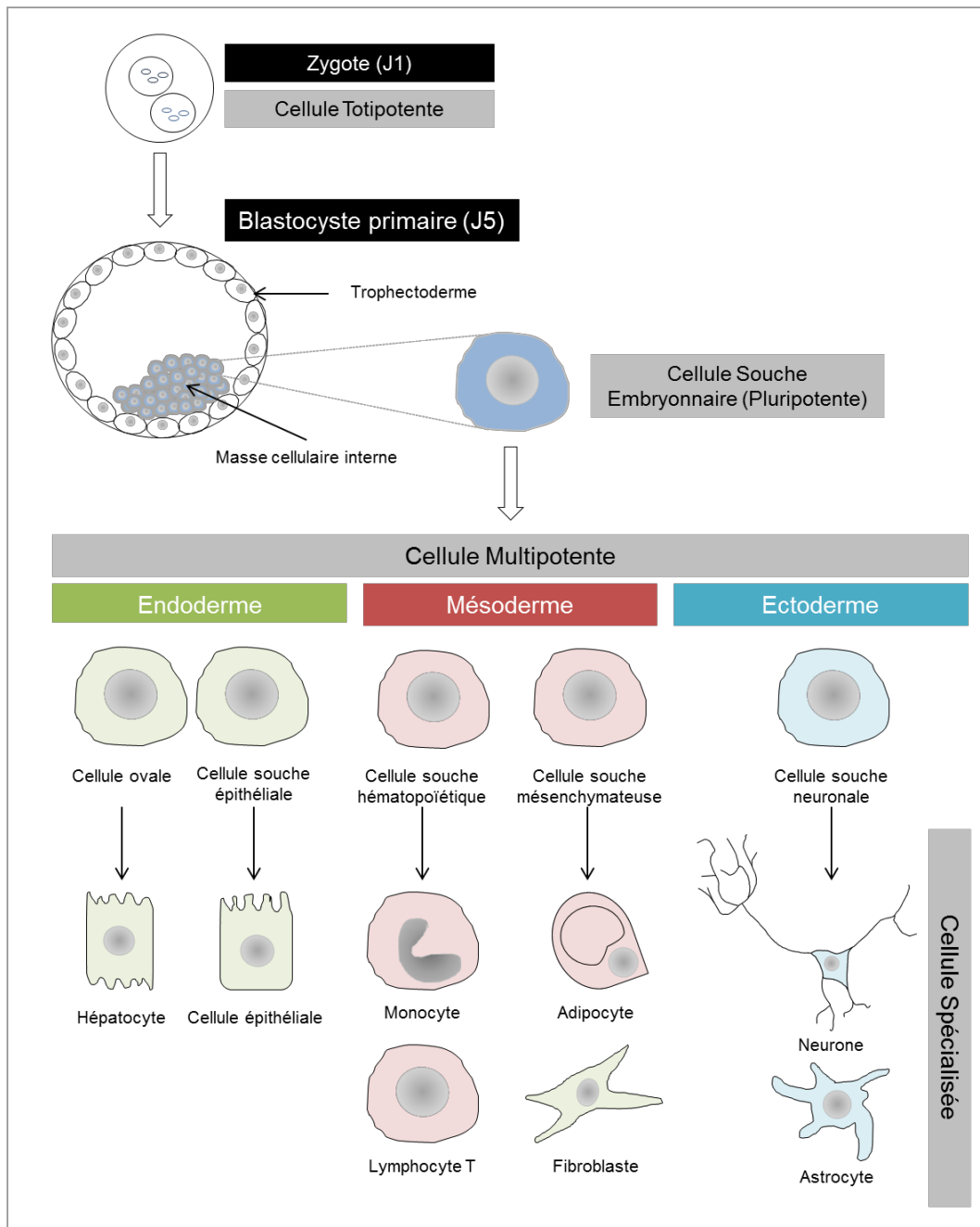


Figure 1. Aperçu du développement embryonnaire humain et de la hiérarchie au sein des cellules souches.

Il est intéressant de noter qu'il existe également, pour certains tissus, différents niveaux de cellules intermédiaires entre les cellules multipotentes et les cellules spécialisées, appelées progéniteurs, tels que : (i) les lymphoblastes B et T, eux-mêmes issus du progéniteur lymphoïde et évoluant vers la formation des lymphocytes B et T respectivement (Awong, 2011 ; Carotta and Nutt, 2008), (ii) les précurseurs neuronaux permettant le

renouvellement des neurones au sein de certaines régions du cerveau (Seaberg and van der Kooy, 2002), (iii) ou encore les cellules satellites, capables de régénérer les fibres musculaires squelettiques après une blessure (Boldrin *et al.*, 2010 ; Yin *et al.*, 2013).

De par leurs propriétés, les cellules souches pluripotentes embryonnaires représentent un potentiel thérapeutique illimité. Cependant, leur utilisation soulève des problèmes éthiques majeurs, liés notamment à l'utilisation et à la destruction d'embryons humains.

III. Reprogrammation cellulaire

L'obtention de cellules possédant les caractéristiques de pluripotence et d'auto-renouvellement d'une cellule ES mais sans passer par l'utilisation d'un embryon, permettrait de s'affranchir d'un problème éthique majeur. La conversion de cellules somatiques spécialisées en cellules souches pluripotentes immatures est aujourd'hui possible, on parle de reprogrammation cellulaire. Ce processus consiste en un remodelage épigénétique visant à restaurer le réseau de régulation transcriptionnelle présent chez les cellules souches embryonnaires.

La possibilité de produire des cellules souches spécifiques d'un individu ouvre de grandes perspectives en thérapie autologue, en thérapie allogénique avec la possibilité de produire des cellules avec les compatibilités tissulaires et groupes sanguins établis, mais aussi en biologie fondamentale et appliquée via la création de modèles cellulaires pathologiques avec différents fonds génétiques, utilisables pour cribler des candidats médicaments.

Une chronologie des événements majeurs dans l'histoire de la reprogrammation cellulaire est présentée en Figure 2.

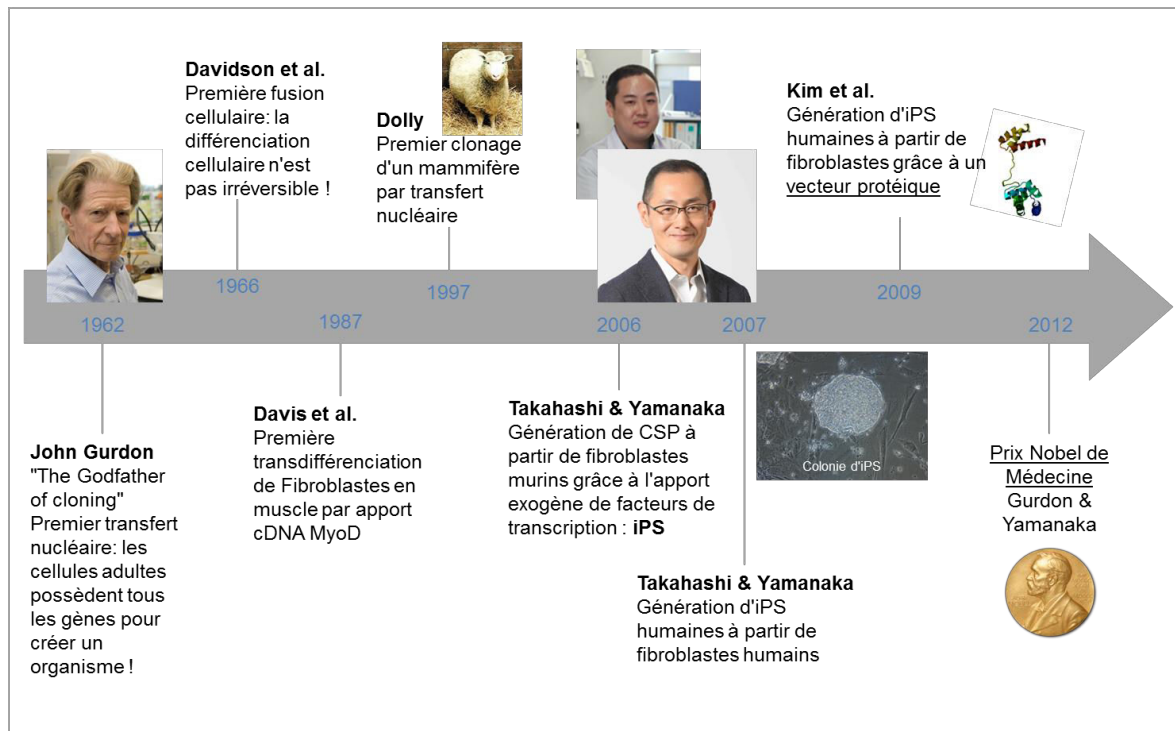


Figure 2. Les faits marquants de l'histoire de la reprogrammation cellulaire.

1. Génération de cellules pluripotentes par transfert nucléaire

Le transfert nucléaire consiste à insérer le noyau d'une cellule au sein du cytoplasme d'une autre. Ainsi toute l'information génétique de la première est prise en charge grâce à la machinerie cellulaire de la seconde.

Bien que les premières expériences de reprogrammation cellulaire soient attribuées à King et Briggs en 1952 (Briggs and King, 1952), c'est John Gurdon, en 1962, alors doctorant à l'université d'Oxford, qui réussit la première reprogrammation cellulaire par transfert nucléaire. Pour cela, Gurdon a transféré le noyau de cellules spécialisées de grenouille (*Xenopus laevis laevis*) dans une cellule-œuf énuclée de la même espèce, conduisant à la formation d'un embryon puis à la naissance de têtards puis de grenouilles adultes, ce qui constitue le premier clonage reproductif de l'histoire (Gurdon, 1962). A travers cette expérience, Gurdon a démontré que toute l'information nécessaire à la formation d'un embryon est présente dans des cellules adultes spécialisées.

Le premier clonage reproductif d'un mammifère a été réalisé en 1997 avec la brebis Dolly, par l'équipe d'Ian Wilmut à l'institut Roslin en Ecosse, en collaboration avec la société PPL Therapeutics, grâce à la méthode du transfert nucléaire développée 35 ans plus tôt par Gurdon. Les auteurs ont réalisé cette prouesse grâce au transfert de noyaux de cellules issues de tissus adultes et fœtaux au sein d'oocytes de brebis non fécondés énuclées et à la réintroduction du zygote obtenu dans l'utérus d'une mère porteuse (Wilmut *et al.*, 1997).

Il faut cependant attendre 2001 et les travaux de Wakayama et ses collaborateurs pour voir la première génération de cellules pluripotentes *in vitro*, capables de se différencier en différents types cellulaires *in vitro* (Wakayama *et al.*, 2001). Les auteurs ont généré ces cellules pluripotentes en transférant le noyau de cellules somatiques issues de cinq souches de souris différentes aux seins d'oocytes murins énuclées, par micro-injection. Les zygotes obtenus ont évolué vers le stade blastocyste à partir duquel des cellules pluripotentes ont pu être isolées et caractérisées. La première génération de cellules pluripotentes humaines par cette technique n'interviendra qu'en 2013 avec les travaux de Tachibana et ses collaborateurs (Tachibana *et al.*, 2013), à partir de cellules fœtales et de nouveaux-nés. La première génération de cellules pluripotentes par transfert du noyau de cellules somatiques humaines adultes au sein d'oocytes énuclées sera réalisée l'année suivante en 2014 (Chung *et al.*, 2014). Le principe de génération de cellules pluripotentes par transfert nucléaire est présenté en Figure 3A.

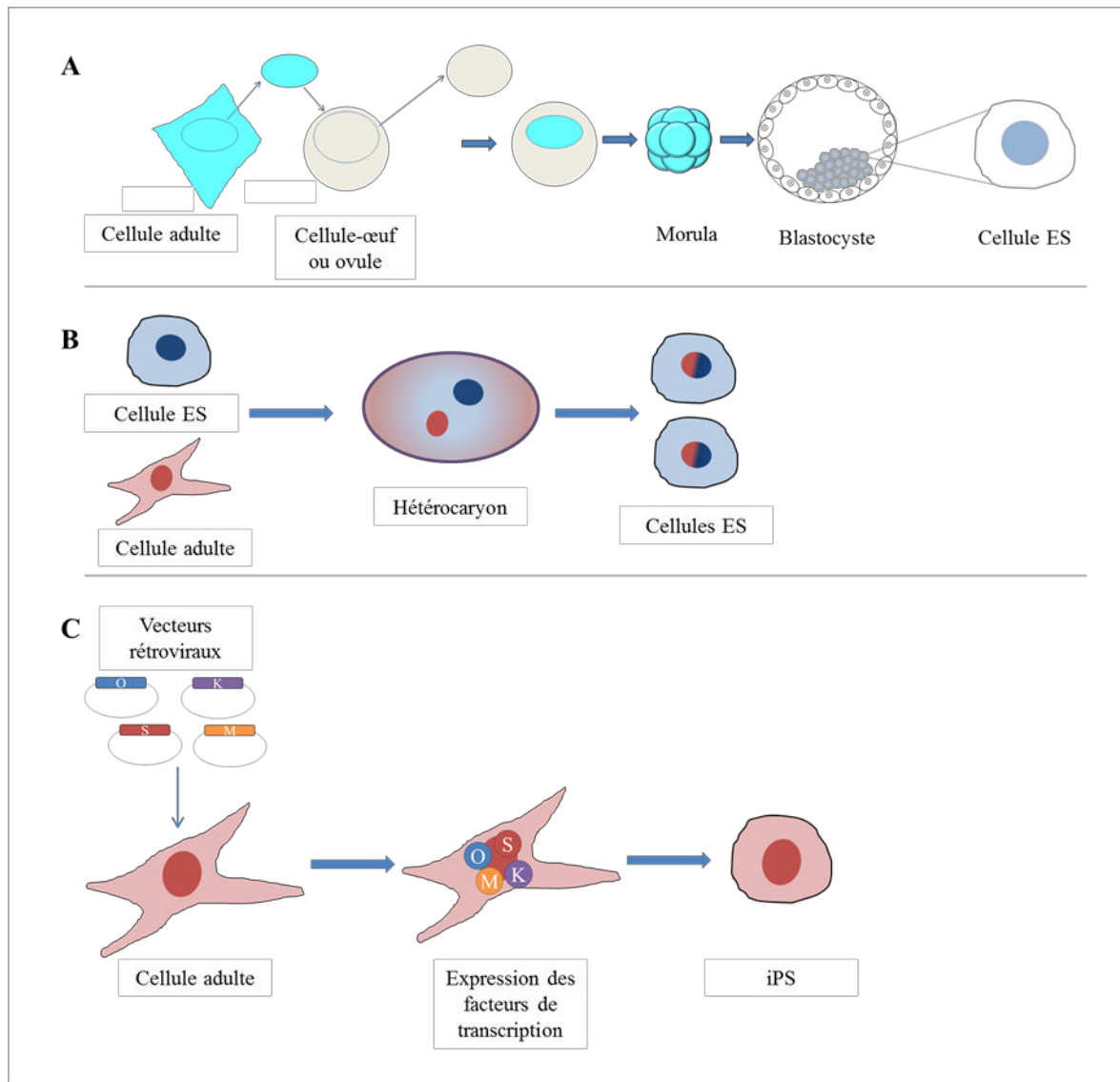


Figure 3. Aperçu des différentes méthodes de reprogrammation cellulaire. (A) Transfert nucléaire, (B) Fusion cellulaire, (C) Reprogrammation par induction de pluripotence.

Cette publication a ainsi démontré la possibilité d'obtenir des cellules souches spécifiques chez l'homme, par fusion de ses cellules somatiques avec un oocyte.

Cette méthode soulève néanmoins de nombreuses questions éthiques : (i) les méthodes de clonage reproductif et thérapeutique reposent sur les mêmes techniques ce qui laisse entrevoir la possibilité de cloner un être humain et une utilisation eugéniste potentielle ; (ii) pour générer des cellules souches pluripotentes, les embryons obtenus, viables, doivent être détruits afin de récupérer les cellules au stade blastocyste ; (iii) les oocytes utilisés sont des cellules surnuméraires non utilisées lors de fécondation *in vitro*, obtenus par une

stimulation ovarienne associée à un prélèvement peu invasif. L'obtention des oocytes hors de ce contexte peut être problématique car il peut conduire à un syndrome d'hyperstimulation chez la donneuse, dû au traitement permettant de favoriser l'hyper ovulation.

2. Génération de cellules pluripotentes par fusion cellulaire

La fusion cellulaire, comme son nom l'indique, consiste à fusionner deux cellules entre elles. Cette technique avait pour but initial d'étudier l'influence du génome d'une cellule sur celui d'une autre cellule.

La première expérience de fusion cellulaire est l'œuvre de Davidson et ses collaborateurs, en 1966 (Davidson *et al.*, 1966). Les auteurs ont fusionné des mélanocytes de hamster avec des cellules souches embryonnaires murines, les deux cellules possédant un marqueur de sélection. Les cellules obtenues, pourtant capables de se diviser dans un milieu doublement sélectif, ne possédaient pas le phénotype combiné des deux cellules mères. Les auteurs ont démontré, à travers ces résultats, que la différenciation cellulaire était un processus réversible, et que des éléments régulant négativement la différenciation étaient exprimés par les cellules. Des travaux postérieurs ont permis de réaliser des fusions cellulaires avec des cellules humaines de différents types et ainsi de confirmer ces observations (Blau *et al.*, 1983).

La fusion entre deux cellules est permise grâce à l'utilisation de molécules chimiques tel que le polyéthylène glycol (PEG), l'application d'une impulsion électrique ou encore l'utilisation du virus Sendai inactivé (Yamanaka and Blau, 2010). Une fois la fusion réalisée, la cellule obtenue possède deux noyaux, on parle d'hétérocaryon. La plupart du temps, cet hétérocaryon se divise et génère des cellules hybrides diploïdes, portant l'information génétique des deux cellules mères. Si l'hétérocaryon est incapable de se diviser, il restera sous la forme d'une cellule tétraploïde.

Cette technologie a également été employée afin de générer des cellules pluripotentes, par la fusion de cellules somatiques avec des cellules ES humaines (Cowan *et al.*, 2005). Le principe de l'obtention de cellules pluripotentes *in vitro* par fusion cellulaire est présenté en Figure 3B.

De manière intéressante, il a été montré que la fusion de cellules somatiques humaines (fibroblastes, lymphocytes) avec des cellules ES murines conduit à la mise en place du programme transcriptionnel propre aux cellules souches humaines (Bhutani *et al.*, 2010 ; Pereira *et al.*, 2008). Ceci souligne la proximité des deux espèces dans la régulation de l'expression génique et permet l'utilisation de la souris comme modèle d'étude pour la biologie du développement et la régulation transcriptionnelle au sein des cellules souches.

Cette méthode a permis de mettre en évidence, via des fusions entre différents types cellulaires, y compris entre différentes espèces, de nombreux mécanismes gouvernant la différenciation, et notamment la présence d'éléments régulateurs dans le cytoplasme des cellules, capables de modifier et influencer l'expression génique d'une autre cellule (Soza-Ried and Fisher, 2012).

En dehors des concepts fondamentaux qu'elle a permis d'identifier, cette méthode de fusion cellulaire n'est en revanche pas une réelle avancée en termes d'applications en médecine régénérative. En effet, elle nécessite l'utilisation d'embryons pour obtenir des hybrides pluripotents et elle est associée à un risque non négligeable de génération de cellules triploïdes.

3. Cellules souches pluripotentes induites (iPS)

i. Concept

En 2006, l'équipe de Shinya Yamanaka réalise une avancée majeure dans l'histoire de la reprogrammation cellulaire en convertissant des cellules spécialisées en cellules souches pluripotentes grâce à l'introduction et l'expression de gènes exogènes codant pour des facteurs de transcription embryonnaires. On parle de cellules souches pluripotentes induites (iPS) (Takahashi and Yamanaka, 2006).

En 1987, la première transdifférenciation cellulaire qui consiste à convertir une cellule spécialisée d'un certain type en une cellule spécialisée d'un autre type, sans passer par le stade cellule souche pluripotente, avait déjà été réalisée avec la conversion de fibroblastes en cardiomyocytes (Davis *et al.*, 1987).

Le Professeur Yamanaka et son équipe ont tiré profit de ces observations ainsi que des travaux réalisés lors des expériences de transfert nucléaire et de fusion cellulaire. Ils ont dressé une liste de 24 facteurs de transcription potentiellement impliqués dans l'induction du réseau de régulation transcriptionnelle propre aux cellules pluripotentes puis ont réalisé la surexpression de différentes combinaisons de ces facteurs, grâce à l'utilisation de vecteurs rétroviraux permettant une intégration génomique et une expression forte des transgènes. Cette première étude, réalisée sur des fibroblastes de souris, a permis d'identifier une combinaison minimale de 4 facteurs, Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc (OSKM) permettant de différencier des cellules somatiques murines en iPS (Takahashi and Yamanaka, 2006). Les iPS obtenues possèdent des propriétés comparables aux cellules ES, à savoir la capacité à s'auto-renouveler et à se différencier en cellules appartenant aux différents feuillets embryonnaires. L'année suivante, les auteurs ont généré des iPS humaines selon le même protocole (Takahashi *et al.*, 2007).

En 2009, bien que paraissant anecdotique dans l'histoire de la reprogrammation, une avancée majeure a pourtant été réalisée par Kim et ses collaborateurs (Kim *et al.*, 2009a). Les auteurs ont réussi à générer des iPS humaines en introduisant les facteurs de transcription embryonnaires utilisés par Yamanaka, mais cette fois-ci directement sous la forme de protéines.

Contrairement aux méthodes de fusion cellulaire et de transfert nucléaire précédemment citées, la génération d'iPS ne nécessite pas la destruction d'embryons et n'est pas dépendante de la disponibilité d'oocytes. De plus cette méthode permet d'obtenir des cellules souches pluripotentes à partir de cellules adultes. C'est pourquoi la reprogrammation cellulaire par induction semble la méthode la plus adaptée et la plus pertinente dans l'optique de générer des cellules pluripotentes humaines à des fins thérapeutiques ainsi que pour des études fondamentales et appliquées.

Pour leurs travaux, John Gurdon et Shinya Yamanaka ont été récompensés par le prix Nobel de Médecine en 2012.

ii. Etat de l'art

Depuis la preuve de concept de Yamanaka, de nombreux protocoles de génération d'iPS ont vu le jour.

Il est aujourd'hui possible de reprogrammer différents types cellulaires tels que les fibroblastes, les kératinocytes ou encore les cellules souches hématopoïétiques. Il est admis que l'efficacité de reprogrammation est étroitement liée au type cellulaire. De manière assez générale, plus une cellule est immature et plus il est facile de la convertir en cellule souche pluripotente.

Il existe à l'heure actuelle tout un panel de vecteurs de reprogrammation, permettant l'apport des facteurs de transcription exogènes au sein des cellules sous différentes formes (ADN, ARN ou directement sous forme de protéines). Ces vecteurs sont généralement regroupés en deux catégories : les intégratifs, permettant une forte expression des facteurs de transcription mais comportant des risques élevés d'insertion mutagène au sein du génome hôte ; les non intégratifs, conduisant généralement à une expression plus modérée des facteurs de transcription mais limitant les risques d'insertion et de déstructuration du génome.

L'application finale des iPS dicte le choix des cellules à reprogrammer ainsi que du vecteur. Typiquement, pour une application thérapeutique, une reprogrammation à l'aide d'un vecteur non intégratif sera privilégiée (González *et al.*, 2011). Ces différentes notions seront abordées dans les chapitres suivants.

4. iPS *versus* Cellules ES

Les iPS et les cellules ES sont similaires en termes de morphologie, d'expression génomique globale et de métabolisme (Panopoulos *et al.*, 2012 ; Stadtfeld *et al.*, 2010). Alors que des études ont mis en avant des différences aux niveaux chromosomique et sub-chromosomique entre les deux types cellulaires associées à un risque anormalement élevé de mutations délétères aux iPS, d'autres ont fait la démonstration, *in vivo*, de l'absence de différences en terme de sécurité entre des cellules somatiques dérivées de cellules ES et d'iPS.

i. Potentiel de différenciation

a. Concept de mémoire épigénétique des iPS

La reprogrammation cellulaire est caractérisée par une modification profonde du paysage épigénétique des cellules, associée à la mise en place du programme transcriptionnel des cellules ES. Bien que les analyses épigénomiques et transcriptomiques mettent généralement en avant un profil épigénétique ainsi qu'une signature transcriptionnelle globalement similaires entre les deux cellules, des différences d'expression géniques et de potentiel de différenciation peuvent être observées dans certains cas (Guenther *et al.*, 2010).

Le processus de reprogrammation est relativement long et imparfait, en particulier l'effacement des marques de méthylation de l'ADN. Il subsiste ainsi des traces du profil épigénétique parental, on parle de mémoire épigénétique. Cette mémoire épigénétique se traduit par la persistance de l'expression de certains gènes somatiques au sein des iPS générées (Kim *et al.*, 2010 ; Marchetto *et al.*, 2009) et tend à disparaître au cours des passages.

Cette expression résiduelle de gènes somatiques influence grandement la différenciation *de novo* des iPS générées, qui ont tendance à se différencier en un type cellulaire similaire à celui des cellules d'origines. Par exemple des iPS générées à partir de cellules β du pancréas se différencieront préférentiellement en cellules sécrétrices d'insuline (Bar-Nur *et al.*, 2011; Polo *et al.*, 2010).

Cette mémoire épigénétique n'est pas forcément une limite, puisqu'elle permet de générer des cellules difficiles à dériver de cellules ES.

b. Persistance de l'expression des transgènes

Les vecteurs intégratifs permettent une intégration génomique des séquences codantes des facteurs de transcription embryonnaires. Une fois la pluripotence atteinte, l'expression de ces transgènes est éteinte. Cependant, l'expression des transgènes peut être réactivée de manière aléatoire, induisant une modification transcriptomique au sein des cellules, notamment responsable de la réduction du potentiel de différenciation des iPS, *in vitro* et *in vivo* (Ramos-Mejía *et al.*, 2012 ; Sommer *et al.*, 2012).

ii. Intégrité génomique et stabilité du caryotype

Il est communément admis que la culture prolongée de cellules pluripotentes, ES ou iPS, conduit à l'acquisition d'anomalies du caryotype. En effet, dès 5 à 10 passages, il est possible de voir apparaître des cellules aneuploïdes, conduisant la plupart du temps à une trisomie 12 ou 17 (Mayshar *et al.*, 2010 ; Mitalipova *et al.*, 2005). Sur ce point, les cellules ES et les iPS sont similaires.

En revanche, le processus de reprogrammation en lui-même semble être à l'origine d'aberrations chromosomiques mais aussi d'anomalies génomiques. Les anomalies génomiques observées comprennent des variations du nombre de copies de gènes (CNV, "Copy Number Variation") mais aussi des mutations somatiques. Ces anomalies concernent notamment certains gènes intervenant dans la régulation du cycle cellulaire connus pour être impliqués dans le développement de certains cancers (Hussein *et al.*, 2011 ; Laurent *et al.*, 2011 ; Mayshar *et al.*, 2010).

Néanmoins, la fréquence de ces mutations tend à diminuer considérablement au fil des passages, conduisant ainsi à une équilibration de la quantité de CNV entre cellules ES et iPS (Bai *et al.*, 2015 ; Laurent *et al.*, 2011). Par ailleurs, il est important de noter que certaines de ces mutations étaient déjà présentes au sein des cellules somatiques utilisées pour générer les iPS, soulignant ainsi l'importance du choix du type cellulaire de départ et pouvant aussi expliquer l'hétérogénéité rapportée entre certaines lignées d'iPS (Gore *et al.*, 2011 ; Mayshar *et al.*, 2010).

iii. Evaluation de la sécurité *in vivo*

Afin d'envisager les iPS comme une solution prometteuse dans le domaine de la thérapie autologue, il est important de s'assurer que les cellules générées ne sont pas dangereuses pour le patient. Les propriétés des cellules dérivées, en termes de réactions immunitaires et de tumorigénèse, ont été évaluées chez l'animal.

Des premières expériences d'injection d'iPS chez des souris syngéniques ont montré la formation de tératomes avec une forte infiltration lymphocytaire. Cette forte réaction immunitaire, non observée au sein des tératomes formés par des cellules ES, serait liée à la surexpression de certains antigènes, notamment Hormad1 et Zg16 (Zhao *et al.*, 2011). Ces résultats sont toutefois à nuancer. D'après Okita et ses collaborateurs, la réaction

immunitaire observée ne serait liée qu'à l'expression d'antigènes embryonnaires et la réponse exacerbée observée avec les iPS serait due à une différenciation plus lente *in vivo* par rapport aux cellules ES (Okita *et al.*, 2011). Il est aujourd'hui admis que les iPS forment efficacement des tératomes, tumeur hétérogènes constituées de différents types cellulaires, lorsqu'elles sont injectées *in vivo* (Gutierrez-Aranda *et al.*, 2010). L'injection de cellules produites à partir d'iPS dans lesquelles il resterait de telles cellules immatures n'est donc pas envisageable d'un point de vue thérapeutique.

Depuis, plusieurs travaux ont démontré, à travers des expériences de transplantation chez l'animal, que les cellules dérivées d'iPS par des méthodes non intégratives n'étaient pas plus immunogènes que celles dérivées des cellules ES. Notamment, Akari et ses collaborateurs ont montré qu'une greffe autologue de peau et moelle osseuse chez la souris à partir d'iPS obtenues par méthode non intégrative ne conduisait qu'à une réponse immunitaire faible, comparable à celle observée avec des cellules dérivées de cellules ES. La méthode de reprogrammation semble en revanche influencer le pouvoir immunogène. En effet, les méthodes intégratives de génération d'iPS conduisent à une immunogénicité supérieure des cellules dérivées, liée à la réexpression de certains transgènes. Ceci confirme ainsi les craintes associées à la reprogrammation par des vecteurs intégratifs (Araki *et al.*, 2013). La même année, l'équipe de Yamanaka a montré que la greffe autologue de neurones dérivés d'iPS chez le primate non humain ne conduisait qu'à une réponse immunitaire très faible, inférieure à celle observée avec une greffe allogénique (Morizane *et al.*, 2013). Enfin, toujours en 2013, Guha et ses collaborateurs ont réalisé la transplantation de corps embryoïdes dérivés d'iPS ou de cellules ES chez des souris syngéniques. Les corps embryoïdes sont des agrégats multicellulaires obtenus par la différenciation des cellules pluripotentes lorsqu'elles sont cultivées en suspension. Les auteurs n'ont pas observé de réponse immunitaire ou de rejet exacerbé avec les corps embryoïdes dérivés d'iPS (Guha *et al.*, 2013).

Il est important de noter qu'à travers ces différentes expériences, aucun développement tumoral des cellules injectées n'a pu être mis en évidence.

Ces données indiquent que les cellules dérivées d'iPS ne sont pas plus tumorigènes ou immunogènes que des cellules dérivées de cellules ES, à condition d'employer une méthode de reprogrammation adaptée, non intégrative. Les cellules utilisées doivent tout

de même être scrupuleusement analysées, afin de s'assurer de l'absence d'anomalies du caryotype et du génome, potentiellement générées au cours de la reprogrammation.

IV. Applications des cellules souches pluripotentes

De par leurs propriétés, en particulier leur capacité à générer tous les types cellulaires d'un organisme, les cellules souches pluripotentes possèdent un potentiel considérable en recherche fondamentale pour la découverte de mécanismes physiopathologiques, l'étude du développement, mais aussi en recherche appliquée pour l'étude de candidats médicaments ou des tests toxicologiques.

L'intérêt majeur des cellules pluripotentes en thérapie est la médecine régénérative, c'est à dire la réparation des tissus endommagés de l'organisme.

Les iPS présentent de nombreux avantages par rapport aux cellules ES dans ces différents domaines. Premièrement, il est aujourd'hui possible de générer des iPS à partir de cellules d'individus sains ou malades, facilement accessibles à partir d'une biopsie ou même de cheveux (Wang *et al.*, 2013). La possibilité de dériver des iPS à partir de cellules adultes offre la possibilité de créer des banques d'iPS avec une grande variabilité génétique. Ceci offre ainsi l'opportunité de développer des modèles d'étude de nombreuses pathologies ainsi que d'étudier l'influence de molécules à visée thérapeutique dans des contextes génétiques très variés, mais surtout d'envisager le développement de thérapies cellulaires autologues régénératives (Figure 4).

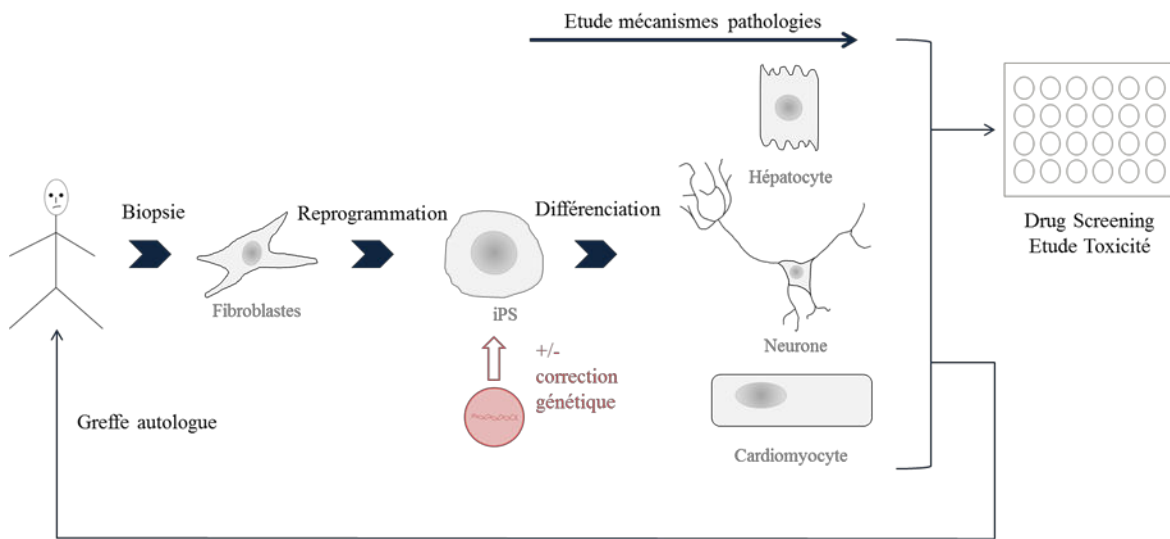


Figure 4. Aperçu des applications potentielles des iPS en recherche et en clinique.

1. Modèles d'études en biologie fondamentale et appliquée

i. Tests toxicologiques

Grâce aux cellules pluripotentes, il est désormais possible de générer différents types cellulaires *in vitro*, notamment des cellules difficilement accessibles chez le patient, comme les hépatocytes ou les cardiomyocytes.

Les hépatocytes et les cardiomyocytes sont les cellules les plus sensibles aux potentiels effets secondaires toxiques des médicaments. La toxicité sur ces organes est souvent la raison de l'abandon du développement d'un candidat médicament. Les modèles animaux classiquement utilisés lors des essais en phase préclinique présentent des différences physiologiques importantes avec l'homme, selon l'organe étudié. Par exemple, un cœur de souris bat presque 10 fois plus rapidement qu'un cœur humain et il est donc difficile d'extrapoler les résultats d'études sur l'arythmie. La possibilité de différencier les cellules ES et les iPS en de nombreux types cellulaires offre ainsi une source inépuisable de ces cellules rares pour réaliser des tests toxicologiques de candidats médicaments (Bellin *et al.*, 2012 ; Drews *et al.*, 2012 ; Scott *et al.*, 2013).

ii. Modèles pathologiques et criblages de molécules thérapeutiques

Les cellules dérivées des cellules pluripotentes peuvent également être utilisées pour mettre au point de nombreux modèles cellulaires de pathologies, utilisables à la fois pour

étudier les mécanismes sous-jacents au développement et à la progression de ces pathologies, mais aussi pour réaliser le criblage de molécules à visée thérapeutique.

La possibilité de générer des iPS à partir d'individus sains ou malades donne accès à une diversité génétique considérable permettant ainsi d'identifier des cofacteurs inconnus intervenant dans l'évolution et le traitement des maladies étudiées. Ceci permet non seulement de faire évoluer notre compréhension des processus normaux et pathologiques et d'adapter le traitement en fonction du patrimoine génétique de l'individu, mais aussi de développer de nouveaux outils diagnostiques grâce aux nouveaux marqueurs identifiés.

Grâce à la technologie des iPS, de nombreux types cellulaires ont pu être dérivés pour des modèles d'études de pathologies et des tests toxicologiques, notamment dans le domaine des maladies cardio-vasculaires et neurologiques (Tableau 1). Les iPS pourraient remplacer les lignées cellulaires souvent issues d'un clone tumoral dans ces analyses.

Tableau 1. Quelques exemples de modèles de pathologies générés grâce aux iPS ainsi que les tests de candidats médicaments réalisés.

Pathologies des patients		Cellules dérivées des iPS générées	Molécules testées
CARDIO-VASCULAIRES	Syndrome du QT long de type 1	Cardiomyocytes	Propanolol
	Syndrome du QT long de type 2	Cardiomyocytes	Cisapride, érythromycine, nadolol, propanolol, ranolazine, sotalol ...
	Syndrome LEOPARD	Cardiomyocytes	-
NEUROLOGIQUES	Amyotrophie spinale	Neurones, motoneurones et astrocytes	Acide valproïque, tobramycine
	Adrénoleucodystrophie liée à l'X	Oligodendrocytes et neurones	Lovastatine, 4-phénylbutyrate
	Maladie d'Alzheimer	Neurones	Inhibiteurs des alpha- et bêta-secretase
	Maladie de Parkinson	Neurones dopaminergiques	-
	Mucopolysaccharidose de type IIIB	Cellules souches neuronales et neurones	-
	Schizophrénie	Neurones	Loxapine, acide valproïque
	Sclérose latérale amyotrophique	Motoneurones et cellules gliales	Acide anarcadique, garcinol, spliceostatine A, trichostatine A
	Syndrome de Rett	Précurseurs neuronaux	IGF-1, gentamicine

HEMATOLOGIQUES	Anémie de Fanconi	Cellules hématopoïétiques	-
	β-Thalassémie	Cellules sanguines	-
	Maladie de Vaquez	Précurseurs hématopoïétiques	-
METABOLIQUES	Déficit en alpha 1-antitrypsine	Cellules "Hépatocytes-like"	-
	Diabète de type 1	Cellules "β-like"	-
	Maladie de Pompe	Cellules musculaires squelettiques	L-carnithine, 3-méthyladénine, GAA recombinante
SYSTEME IMMUNITAIRE	Encéphalite herpétique	Cellules du système nerveux central	-
	Granulomatose septique chronique *	Macrophages, neutrophiles	-
Références : Bellin <i>et al.</i> , 2012 ; Robinton and Daley, 2012 ; Wu and Hochedlinger, 2011 ; *Brault <i>et al.</i> , 2014			

2. Médecine régénérative

L'allongement de la durée de vie est associé à l'émergence de nouvelles pathologies, parmi lesquelles on trouve de nombreuses maladies dégénératives. En dehors de ces pathologies liées à l'âge, il persiste de nombreuses maladies pour lesquelles le seul traitement efficace est le remplacement de l'organe défaillant. On compte notamment des cancers (leucémies, lymphomes, poumon, rein), des désordres neurologiques (maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer, accidents vasculaires cérébraux), des maladies cardiaques (infarctus et insuffisance cardiaque), des maladies oculaires (glaucome, dégénérescence maculaire) ou encore des maladies auto-immunes (lupus érythémateux, arthrite rhumatoïde).

La transplantation d'organe est à ce jour le seul traitement efficace pour certaines de ces pathologies. Ce procédé thérapeutique est néanmoins associé à des problèmes de disponibilité des greffons ainsi qu'à des rejets. De plus, il est à ce jour impossible de remplacer certains tissus, notamment les tissus du système nerveux central.

C'est pourquoi, la possibilité de générer *in vitro* tous les types cellulaires à partir d'une cellule unique ouvre la perspective de pouvoir un jour réparer tous les tissus de l'organisme. Ces 20 dernières années, de nombreux protocoles de différenciation *in vitro* ont vu le jour et il devient ainsi possible d'accéder à de nombreux types cellulaires, y

compris à des précurseurs difficilement accessibles voir inaccessibles *in vitro*, tels que les précurseurs neuronaux, et ce même chez l'homme (Keller, 1995 ; Wobus, 2005).

i. Applications cliniques des cellules ES

Les travaux précurseurs sur ces cellules pluripotentes ont permis de faire la preuve de concept de la fonctionnalité des cellules qui peuvent en être dérivées et ont ouvert la voie au développement de stratégies thérapeutiques basées sur ces cellules. A ce jour, cinq essais cliniques basés sur l'utilisation de cellules dérivées de cellules ES humaines ont été approuvés par la FDA (Food and Drug Administration), pour le traitement de pathologies oculaires, cardiaques et métaboliques (Tableau 2).

Tableau 2. Liste des essais cliniques de thérapie cellulaire réalisés à partir de cellules dérivées de cellules ES.

Initiation	Pathologie	Cellules transplantées	Porteur de projet	Pays	Référence de l'essai (ClinicalTrials.gov)
2010	Traumatisme médullaire	Oligodendrocytes	GERON Corporation	Royaume-Uni/Etats-Unis	NCT01217008
Le 14 novembre 2011, abandon de l'essai clinique de phase I pour des raisons financières.					
2011	Dégénérescence maculaire liée à l'âge	Epithélium pigmentaire rétinien	Ocata Therapeutics	Etats-Unis	NCT01344993
Neuf patients âgés de 55 ans et plus ont reçu une greffe d'épithélium pigmentaire rétinien. Vingt-deux mois après la greffe, aucun signe de prolifération anormale, de rejet ou d'affection oculaire ou systémique n'a pu être décelé. Une amélioration de l'acuité visuelle globale a été observée.					
2011	Dystrophie maculaire de Stargardt	Epithélium pigmentaire rétinien	Ocata Therapeutics	Etats-Unis	NCT01345006
Neuf patients âgés de 18 ans et plus ont reçu une greffe d'épithélium pigmentaire rétinien. Vingt-deux mois après la greffe, aucun signe de prolifération anormale, de rejet ou d'affection oculaire ou systémique n'a pu être décelé. Une amélioration de l'acuité visuelle globale a été observée.					
2013	Insuffisance cardiaque	Cellules souches de muscle squelettique	Assistance Publique - Hôpitaux de Paris	France	NCT02057900
Le 21 Octobre 2014, la première transfusion de cellules souches cardiaques dérivées de cellules souches embryonnaires a été réalisée par l'équipe du Professeur Menasché à l'Hôpital George Pompidou à Paris, chez une femme de 68 ans souffrant d'une insuffisance cardiaque sévère.					
2014	Diabète de type 1	Cellules endodermiques de pancréas	ViaCyte	Etats-Unis	NCT02239354
40 patients âgés de 18 à 55 ans sont en cours de recrutement pour un essai de phase I/II afin d'évaluer la toxicité ainsi que l'efficacité du produit de thérapie cellulaire proposé.					

ii. Applications cliniques des iPS

Le traitement d'un patient par des cellules dérivées des siennes limite fortement le risque de rejet, étant donné que les patrimoines génétiques sont identiques. Il paraît également envisageable de combiner la technologie des iPS à celle de la thérapie génique afin de corriger des mutations responsables de certaines pathologies, notamment lorsqu'il est impossible de prélever des tissus sains chez le patient pour générer des iPS.

a. Preuve de concept chez l'animal

Afin de vérifier l'efficacité de protocoles de thérapies cellulaires basés sur l'utilisation de cellules dérivées d'iPS, plusieurs équipes ont réalisé des transplantations chez l'animal de différents types cellulaires dérivés d'iPS humaines. Il a également été montré qu'il était possible de générer et de greffer des tissus, voir des organes entiers fonctionnels à partir d'iPS humaines (Tableau 3).

En 2013, Takebe et ses collaborateurs ont réussi la prouesse de générer un foie vascularisé *in vitro* à partir d'iPS humaines. Le foie a été généré sous forme de plusieurs proto-organes, transplantés ensuite chez un modèle de souris immunodéficiente où le foie avait été soumis à un traitement chimique induisant des dommages létaux irréversibles. Grâce à ce protocole, un tissu hépatique sain a pu être reconstitué et sa fonction rétablie, comme l'atteste la production de protéines humaines entre 7 et 14 jours après transplantation et la mise en place d'une métabolisation caractéristique d'un foie humain entre 30 et 60 jours (Takebe *et al.*, 2014).

Ces différents résultats ont permis de mettre en évidence la fonctionnalité *in vivo* de cellules dérivées d'iPS humaines mais aussi la possibilité de générer des organes fonctionnels *in vitro* à partir de ces cellules, permettant d'entrevoir un peu plus la possibilité d'appliquer de telles stratégies en thérapie humaine.

Tableau 3. Utilisation de cellules dérivées d'iPS en thérapie cellulaire régénérative chez l'animal.

Pathologies	Modèle	Cellules	Résultats	Références
Névrite optique	Rat	Progéniteurs oligodendrocytiques humains	Maturation <i>in vivo</i> en oligodendrocytes et remyélinisation du nerf optique en 8 semaines	Pouya <i>et al.</i> , 2011
Diabète de type 1	Souris NOD	Cellules β	Normalisation du taux de glucose sanguin en 2 à 4 jours après transplantation	Jeon <i>et al.</i> , 2012
Polyneuropathie diabétique	Souris	Cellules de la crête neurale	4 semaines après la transplantation, amélioration des fonctions neuronales et vasculaires endommagées.	Okawa <i>et al.</i> , 2013
Lésions hépatiques	Souris	Proto-foies humains	Vascularisation dès 24-48h après transplantation et instauration d'un métabolisme hépatique humain en 30-60 jours.	Takebe <i>et al.</i> , 2014
Rétinite pigmentaire	Souris	Epithélium rétinien pigmentaire humain	Réduction significative de la dégradation des photorécepteurs dès 14 jours après transplantation	Sun <i>et al.</i> , 2015

b. Premier essai clinique utilisant des iPS

La preuve de concept de l'utilisation de cellules dérivées d'iPS pour le traitement de pathologies humaines a été initiée en Août 2014, à l'institut RIKEN au Japon, par l'équipe du Docteur Masayo Takahashi (Reardon and Cyranoski, 2014).

Les auteurs ont réalisé la transplantation autologue d'un épithélium rétinien pigmentaire dérivé d'iPS générées à l'aide d'un vecteur épisomique. La patiente, âgée de 70 ans, souffre de dégénérescence maculaire liée à l'âge, l'une des principales causes de cécité chez les individus âgés.

Il est important de noter que les auteurs avaient dans un premier temps analysé la preuve l'efficacité de ce traitement chez la souris (Maeda *et al.*, 2013) ainsi que l'absence de rejet ou de formation de tumeur chez le primate non humain (Kamao *et al.*, 2014).

Les tests d'évaluation de la sécurité et de l'efficacité du protocole sont en cours. S'ils s'avéraient concluants, ce premier essai clinique ouvrirait certainement la voie à de nombreux autres et permettrait d'initier une nouvelle aire de la médecine, celle de la médecine régénérative personnalisée.

V. Limites des cellules pluripotentes et problèmes soulevés

Bien que prometteuses pour de nombreuses perspectives et applications, l'utilisation de cellules ES nécessite l'utilisation d'embryon, soulevant ainsi des problèmes éthiques ainsi que des considérations morales majeurs. C'est pourquoi la recherche et le développement à partir de cellules ES humaines est soumis à une réglementation stricte.

En France, les premières lois de la bioéthique de 1994 interdisaient toute recherche sur l'embryon humain et les cellules ES humaines. Depuis 2004, des dérogations exceptionnelles sont accordées pour une durée de 5 ans si les recherches sont susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs et s'il n'existe pas de méthode alternative d'efficacité comparable. Les embryons utilisés sont issus de fécondations *in vitro* qui ne font plus partie du projet parental. C'est l'Agence de la Biomédecine qui étudie et autorise les projets de recherche. En 2013, la loi est révisée en faveur de l'autorisation encadrée de la recherche sur l'embryon humain. Le projet doit être scientifiquement pertinent, avoir une finalité médicale, ne pouvoir être conduit qu'avec des embryons humains et enfin respecter des garanties éthiques (source : Le Monde). Au niveau mondial, la législation est très différente d'un pays à l'autre.

En raison du formidable potentiel d'application des cellules ES, notamment dans le traitement de certaines pathologies pour lesquelles aucun traitement efficace n'existe à ce jour, la loi initiale proche de l'interdiction s'est assouplie mais en conservant un encadrement fort. La reprogrammation cellulaire permet aujourd'hui de produire des cellules pluripotentes sans embryon, permettant d'éviter certains blocages éthiques.

Il est important de prendre conscience que les iPS sont également à l'origine de certains débats. Premièrement, la possibilité de pouvoir rajeunir des cellules et des tissus laisse entrevoir le vieux rêve d'une quête de la jeunesse éternelle. Deuxièmement, récemment, une équipe a réussi à générer, à partir de cellules adultes, des iPS possédant des caractéristiques de cellules totipotences, c'est-à-dire de zygote (Abad *et al.*, 2013). Cela signifie qu'il deviendrait possible de générer des embryons à partir d'une cellule adulte, relançant ainsi tout le questionnement sur le concept du clonage reproductif, avec la possibilité de reproduire un être humain à l'identique. L'utilisation clinique des iPS étant finement contrôlé par les organismes de réglementation tels que l'Agence européenne des

médicaments (EMA) et la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis, il paraît difficilement imaginable d'utiliser ces cellules à des fins de clonage reproductif.

En résumé, les iPS possèdent les mêmes caractéristiques que les cellules ES. Elles sont capables de s'auto-renouveler indéfiniment et de se différencier en toutes les cellules d'un organisme. Elles sont générées par la surexpression de facteurs de transcription embryonnaires au sein de cellules somatiques et ne nécessitent donc pas l'utilisation d'embryons. Elles représentent ainsi un outil très intéressant aussi bien en biologie fondamentale que pour des applications en médecine, avec la possibilité de générer des cellules spécifiques d'un individu.

CHAPITRE 2

Aspects moléculaires de la pluripotence

Le phénotype particulier des cellules souches pluripotentes est maintenu grâce à un réseau de régulation transcriptionnelle extrêmement complexe, impliquant de nombreux facteurs de transcription (Chambers and Tomlinson, 2009 ; Kim *et al.*, 2008). Ce réseau de régulation transcriptionnelle est étroitement lié à un ensemble de marques épigénétiques, gouvernant l'expression de ces facteurs de transcription.

I. Régulation transcriptionnelle

Le réseau de régulation transcriptionnelle de la pluripotence implique de nombreux facteurs de transcription, dont l'activation est étroitement liée à la signalisation cellulaire. Le noyau central de la régulation est constitué par Oct4, Sox2 et Nanog (OSN). En effet, il semblerait qu'au moins 353 gènes soient les cibles communes de ces trois facteurs au sein des cellules ES. Ensemble, ils forment une boucle de régulation positive sur les gènes de pluripotence et négative sur les gènes de différenciation. Il suffit que l'expression de l'un de ces trois gènes soit dérégulée pour que les cellules ES s'engagent dans une voie de différenciation (Boyer *et al.*, 2005 ; Chambers and Tomlinson, 2009). D'autres facteurs, tels que c-Myc et Klf4, jouent également un rôle très important dans le maintien de la pluripotence. C-Myc intervient dans la régulation du cycle cellulaire ainsi que l'accessibilité chromosomique pour OSN tandis que Klf4 semble jouer un rôle d'activateur transcriptionnel en amont des trois facteurs centraux (Kim *et al.*, 2008 ; Niwa, 2007). Un autre acteur moins étudié mais également très important dans le réseau transcriptionnel des cellules pluripotentes est Lin28. Ce régulateur intervient dans la maturation de certains micro-ARN (miARN) impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et dans le contrôle du métabolisme des cellules souches (Xu *et al.*, 2009 ; Zhu *et al.*, 2011). Ces facteurs interagissent entre eux et sont déterminants pour l'induction et la maintenance de la pluripotence. Les structures secondaires de ces différents régulateurs de la pluripotence sont présentées en Figure 5.

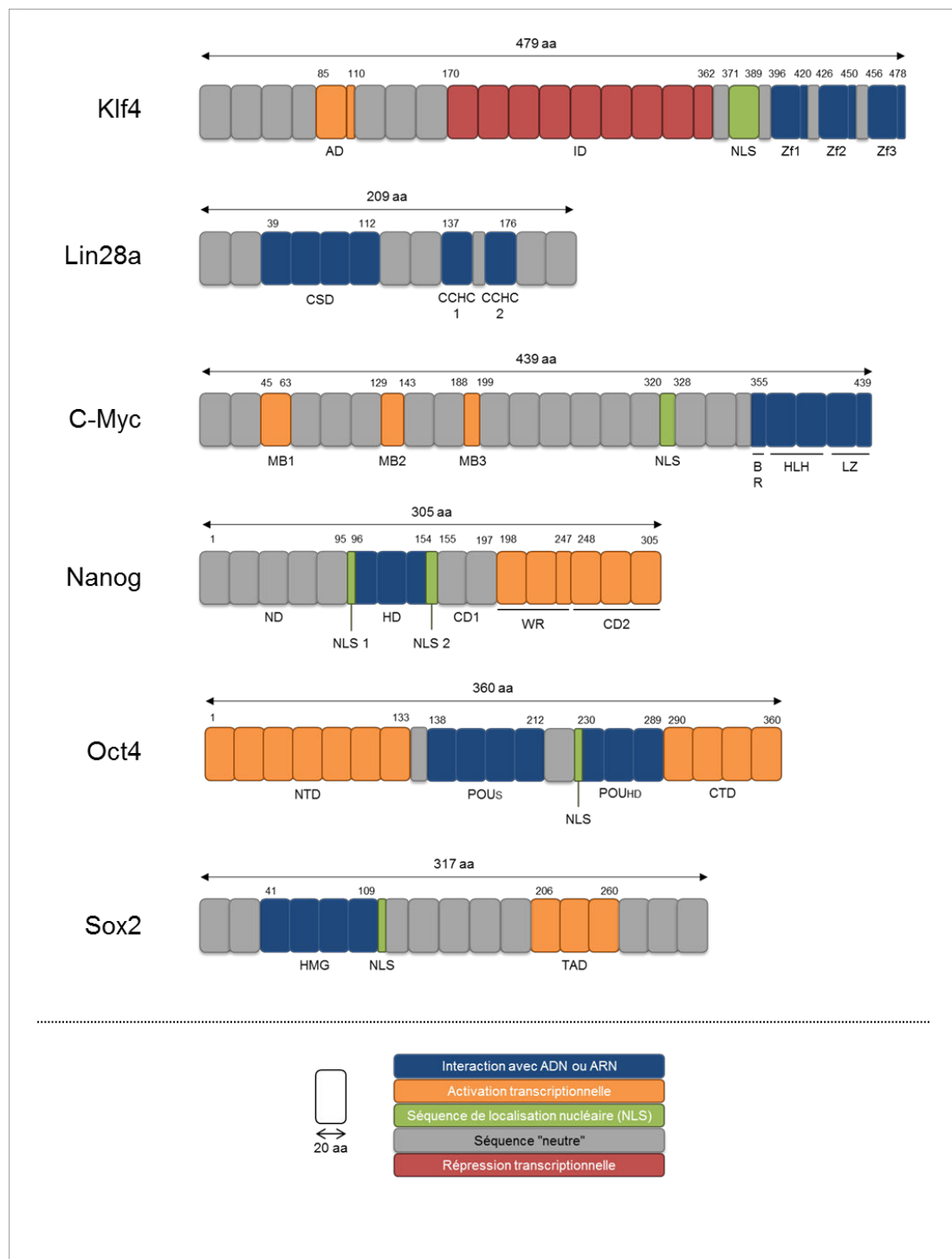


Figure 5. Représentation des acteurs majeurs de la régulation transcriptionnelle chez les cellules souches embryonnaires. *Klf4* : AD (domaine activateur), ID (domaine répresseur), ZF (domaine en doigt de zinc) ; *Lin28a* : CSD (Cold-Shock Domain), CCHC (domaine en doigt de zinc) ; *c-Myc* : MB (Mycbox), BR (région basique), HLH (domaine en hélice-boucle-hélice), LZ (domaine de type glissière à leucine) ; *Nanog* : ND (domaine N-terminal), HD (homéodomaine), CD (domaine C-terminal), WR (domaine riche en tryptophane) ; *Oct4* : NTD (domaine de trans-activation N-terminal), POU_S (domaine POU-spécifique), POU_{HD} (homéodomaine de type POU), CTD (domaine de trans-activation C-terminal) ; *Sox2* : HMG (High Mobility Group), TAD (Domaine de trans-activation).

1. Oct4

Oct4 (ou Oct3/4, ou "POU domain, class 5, transcription factor-1" (Pou5f1)) est un facteur de transcription appartenant à la classe V de la famille POU. Il joue un rôle central dans le maintien de la pluripotence.

Il existe deux isoformes de cette protéine chez l'homme, Oct4A et Oct4B, codées par le même gène *pou5f1*, mais générés post-transcription par un épissage alternatif (Takeda *et al.*, 1992). Bien que les deux isoformes soient présents au cours de l'embryogénèse humaine, leur distribution spatiale et temporelle est différente. Seule l'isoforme A est nucléaire et retrouvé au sein des cellules ES humaines (Cauffman *et al.*, 2006).

Les deux isoformes contiennent deux domaines de trans-activation, l'un en position N-terminal et l'autre en position C-terminale. Alors que le domaine C-terminal est commun, les domaines N-terminaux présentent des différences considérables. En particulier, le domaine N-terminale de l'isoforme B ne permet pas la fixation aux régions promotrices reconnues par Oct4A (Lee *et al.*, 2006a), laquelle est associée à l'établissement et au maintien de la pluripotence. Comme les autres membres de cette famille de facteurs de transcription, il exerce son action grâce à ses deux domaines de reconnaissance de l'ADN de type POU : un domaine POU spécifique (POU_S) et un homéodomaine à très haute affinité (POU_{HD}) (Klemm and Pabo, 1996). Ces structures en hélice-coude-hélice permettant la fixation sur une séquence nucléotidique octamérique consensus ATGCAAAT au niveau des régions promotrices ou activatrices des gènes cibles (Herr and Cleary, 1995 ; Klemm *et al.*, 1994).

Oct4 interagit avec un partenaire transcriptionnel, le facteur Sox2, formant ainsi un hétérotrimère avec l'ADN au niveau des promoteurs de nombreux gènes de pluripotence. Ainsi, plus de la moitié des promoteurs occupés par Oct4 sont aussi occupés par Sox2 (Boyer *et al.*, 2005). L'expression d'Oct4 est elle-même régulée par le dimère Oct4-Sox2 (Okumura-Nakanishi *et al.*, 2005)

Oct4 agit également sous la forme d'un homodimère au niveau d'autres régions "enhancer", constituées d'une séquence octamérique (ATGCAAAT) et d'un domaine palindromique séparés par 5 paires de bases, ATTTG +5 CAAAT, appelé "Palindromic Oct4 Recognition Element" (PORE), reconnu spécifiquement par les protéines à homéodomains. Ainsi,

Oct4 est capable de se fixer sur ces régions sous forme de monomère, d'homodimère ou encore d'hétérodimère (Botquin *et al.*, 1998).

Il est important de noter qu'il existe une variabilité dans les séquences reconnues par Oct4 au niveau des régions "enhancer", différant du motif octamérique consensuel. Par exemple, le gène *utf1*, dont l'expression est activée grâce à l'action du dimère Oct4/Sox2, présente un motif octamérique ATGCTAAT ; le gène *fgf4* présente quant à lui un motif octamérique ATGCTAGT. Cette variabilité pourrait permettre à d'autres membres de la famille POU de se fixer aux promoteurs de certains gènes de pluripotence, permettant la formation de complexes activateurs ou répresseurs de la transcription (Nishimoto *et al.*, 1999a; Remenyi, 2003)

Il a été montré que la variation du niveau d'expression d'Oct4 seul était suffisante pour orienter la différenciation des cellules ES (Niwa *et al.*, 2000). Notamment, une diminution de 50% de l'expression d'Oct4 au sein de cellules ES humaines induit une différenciation en endoderme définitif et en trophoctoderme, avec une augmentation de l'expression du facteur associé au trophoblaste Cdx2 (Hay *et al.*, 2004 ; Matin, 2004) ; au contraire, une augmentation de son expression de 150% dirige la différenciation vers la formation de mésoderme et d'endoderme primaire extra embryonnaire (Frum *et al.*, 2013 ; Hay *et al.*, 2004). Oct4 est fortement exprimé avant la gastrulation dans toutes les cellules de l'embryon, et notamment au sein des cellules ES constituant la masse cellulaire interne du blastocyste. Son expression tend à disparaître au cours de la différenciation cellulaire en endoderme et mésoderme (Okamoto *et al.*, 1990 ; Rosner *et al.*, 1990 ; Schöler *et al.*, 1990).

2. Sox2

Sox2, ou "SRY (sex determining region Y)-box 2" est un membre de la famille SOX, facteurs de transcription à domaine HMG, pour "High Mobility Group". Ce domaine d'activation, constitué de 79 acides aminés, est situé dans la région N-terminale de la protéine. Il permet au facteur de se fixer au niveau du sillon mineur de la double hélice d'ADN, sur un motif spécifique A/T A/T CAAAG (Bowles *et al.*, 2000). Son domaine de trans-activation (TAD), constitué de 55 acides aminés avec une forte proportion de sérines, est situé en position C-terminale. Les facteurs de transcription à domaine HMG sont

connus pour interagir avec les facteurs de transcription à domaine POU (Zwilling *et al.*, 1995).

Au sein des cellules pluripotentes, Sox2 joue le rôle de partenaire transcriptionnel d'Oct4 ; il agit en synergie avec ce dernier via la fixation sur des régions promotrices appelées "enhancer", comprenant les séquences de reconnaissance des deux facteurs, formant ainsi un complexe ternaire activateur. Ce phénomène a été mis en évidence pour la première fois chez la souris et l'homme avec FGF4, protéine impliquée notamment dans le développement du blastocyste (Ambrosetti *et al.*, 1997, 2000). L'activation des régions "enhancer" oct/sox en amont des gènes de pluripotence *fgf4*, *utfl*, *fbxo15* ou *nanog* peut cependant être compensée par Sox3 lors d'une inhibition de l'expression de Sox2 (Wang *et al.*, 2012b).

Dans le cœur de la pluripotence, Sox2 semble jouer principalement un rôle de maintien de l'expression d'un niveau basal d'Oct4, assurant ainsi la stabilisation de l'état pluripotent. Une boucle d'autorégulation positive existe entre ces deux facteurs, l'hétérodimère induisant l'expression des deux facteurs, permettant le maintien du niveau d'expression basal d'Oct4 associé à l'état pluripotent des cellules ES (Okumura-Nakanishi *et al.*, 2005 ; Tomioka *et al.*, 2002). Sox2 peut également activer la transcription de certains facteurs nécessaires au maintien de l'expression d'Oct4, tel que Nr5a2 (Masui *et al.*, 2007).

Enfin, Sox2 est important dans la régulation globale au sein des cellules ES, agissant en réprimant différentes voies de différenciation selon les partenaires avec lesquels il est associé. Avec Nanog et Oct4, il inhibe la différenciation en trophoctoderme, c'est-à-dire la couche de cellules externe du blastocyste évoluant en trophoblaste, le tissu précurseur de certaines cellules du placenta ; Partenaire de Nanog, et Esrrb, Tbx3 et Tcl1, trois autres facteurs situés en aval dans la hiérarchie du réseau de pluripotence, il empêche la différenciation cellulaire dans les différents tissus épiblastiques, à savoir mésoderme, ectoderme et endoderme (Ivanova *et al.*, 2006).

3. Nanog

Nanog est un facteur de transcription à homéodomaine. Chez l'homme, il est constitué de 305 acides aminées répartis sur cinq domaines distincts occupant des fonctions bien

particulières : (i) un domaine N-terminal riche en sérine, qui contrairement à celui de la protéine murine, ne semble pas être actif ; (ii) un homéodomaine de type Nk-2 permettant l'interaction avec sa séquence nucléotidique cible ; (iii) un premier domaine C-terminal CD1 ; (iv) un premier domaine de trans-activation riche en tryptophane (WR) ; (v) un deuxième domaine de trans-activation situé à l'extrémité C-terminale (CD2) (Jauch *et al.*, 2008; Oh *et al.*, 2005a ; Pan and Pei, 2005).

Nanog est capable de se dimériser via son domaine riche en tryptophane. Sous forme d'homodimère, il peut alors intervenir dans l'autorenouvellement des cellules ES par une voie cytokine-indépendante (Mullin *et al.*, 2008).

Nanog est exprimé au sein des cellules ES humaines et murines mais absent des cellules différenciées (Chambers *et al.*, 2003 ; Mitsui *et al.*, 2003). Son expression est en grande partie régulée par l'action de l'hétérodimère Oct4/Sox2, agissant au niveau de motifs oct/sox présents dans la région promotrice du gène (Rodda *et al.*, 2005).

Plus de 90% des promoteurs occupés par Oct4 et Sox2 le sont aussi par Nanog, les sites de fixation des trois facteurs étant d'ailleurs très proches les uns des autres, soulignant ainsi la collaboration de ces trois facteurs dans le maintien de la pluripotence. En plus d'activer directement de nombreux gènes de pluripotence, ces trois facteurs collaborent pour inhiber l'expression de gènes codant pour des facteurs de transcription tissu-spécifiques dans les cellules ES (Boyer *et al.*, 2005).

Nanog est également capable de s'associer avec d'autres facteurs de transcription, au niveau de régions promotrices de type "enhancer", comme observé avec le duo Oct4/Sox2 ; c'est notamment le cas avec Sall4, avec lequel il occupe de nombreux promoteurs de gènes de pluripotence et forme une boucle d'auto-régulation au sein des cellules ES (Wu *et al.*, 2006).

Nanog est un facteur clé du cœur de la pluripotence. En effet, la délétion du gène *nanog* conduit à la perte de pluripotence des cellules ES, avec une différenciation en cellules de l'endoderme. Nanog est un inhibiteur direct du facteur de différenciation endodermique Gata6 (Fujikura, 2002) et un activateur de gènes directement impliqués dans le maintien de la pluripotence, tel que *rex1* (Adewumi *et al.*, 2007 ; Boulting *et al.*, 2011). De même, il a été montré que le maintien de son expression dans des conditions favorisant normalement

la différenciation des cellules ES murines, comme l'utilisation d'un antagoniste de LIF (Leukemia Inhibitory Factor), cytokine de la famille de l'interleukine 6 empêchant la différenciation cellulaire, ou encore de l'acide rétinoïque induisant une différenciation neuronale, prévient la différenciation des cellules ES (Chambers *et al.*, 2003).

Nanog semble donc être un régulateur global de la différenciation cellulaire, son niveau d'expression influençant la différenciation cellulaire. Alors qu'une diminution modérée de son expression (30-50%) semble diriger la différenciation cellulaire vers la formation d'endoderme extra embryonnaire (Hough *et al.*, 2006), une diminution plus marquée (plus de 50%) oriente la différenciation vers la formation de cellules du trophoctoderme, du mésoderme, de l'ectoderme et des cellules de la crête neurale, en plus de l'endoderme (Hatano *et al.*, 2005).

Nanog peut donc être considéré comme un régulateur primordial du réseau de pluripotence. Il agit comme un véritable rhéostat, dont la dérégulation de l'expression entraîne irrémédiablement la différenciation des cellules ES.

4. Klf4

Klf4, pour Krueppel-like factor 4, est un facteur de transcription de la famille Sp/klf (specificity protein/Krueppel-like factor). Les protéines de la famille Klf interviennent dans de nombreux processus cellulaires, tels que la prolifération, l'apoptose, la différenciation et le développement, en activant ou inhibant l'expression de différents gènes. Sa liaison à l'ADN est permise grâce à trois motifs en doigt de zinc de type Cys₂-His₂ situés en position C-terminale de la protéine, interagissant spécifiquement avec des séquences nucléotidiques G/AG/AGGC/TGC/T ou des éléments CACCC. Klf4 est également caractérisé par la présence de deux domaines impliqués dans la régulation transcriptionnelle : un domaine activateur en position N-terminale et un domaine inhibiteur en position centrale, lui permettant d'exercer une action activatrice ou répressive sur la transcription, selon le gène cible (Shields and Yang, 1998 ; Yet *et al.*, 1998).

Klf4 peut être à la fois un oncogène et un suppresseur de tumeur, selon le contexte. Il semble augmenter l'affinité de p53 pour ses cibles avec un effet sur l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence. Suite à des dommages causés à l'ADN, p53 active

l'expression de Klf4. Dans les cancers gastriques et colorectaux, l'expression de Klf4 est diminuée (Wei *et al.*, 2005 ; Zhao *et al.*, 2004). En revanche, dans le cancer du sein ou le carcinome épidermoïde de l'oropharynx, il semblerait que l'expression de p53 soit inhibée par Klf4 (Foster *et al.*, 2000 ; (Foster *et al.*, 1999).

Au sein des cellules ES, KLF4 semble jouer un rôle d'activateur transcriptionnel majeur en amont des principaux facteurs impliqués dans le maintien de la pluripotence. Klf4 assure ce rôle avec Nanog, avec lequel il intervient au niveau de promoteurs distaux pour induire l'expression de gènes du réseau de pluripotence, tels que *pou5f1*, *sox2*, *nanog*, *esrrb*. Il est également impliqué dans l'auto-renouvellement des cellules en activant l'expression de gènes régulant le cycle cellulaire, tels que *c-myc*. Il empêche également la différenciation en endoderme en inhibant l'expression de gènes tel que *gata4*, *gata6*, *sox17*. Il a d'ailleurs été montré que la délétion du gène *klf4* conduisait à la différenciation des cellules ES (Aksoy *et al.*, 2014 ; Jiang *et al.*, 2008). Enfin, Klf4 assure un rôle de co-activateur transcriptionnel d'Oct4 et Sox2 au niveau de certains promoteurs de gènes appartenant au réseau de pluripotence, tel que *lefty1*, mais aussi pour sa propre activation. Dans ce cas de figure, Klf4 interviendrait au niveau du promoteur proximal et non pas d'éléments distaux comme Oct4 et Sox2 (Nakatake *et al.*, 2006).

Toutes ces données indiquent que Klf4 est un acteur central du réseau de pluripotence, assurant un rôle dans le maintien de la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules ES.

5. c-Myc

c-Myc, ou "Myc proto-oncogene protein", ou plus simplement Myc, est un facteur de transcription majeur de tous les types cellulaires, impliqué dans de nombreux processus tels que la prolifération, l'inhibition de la différenciation, la croissance cellulaire, le métabolisme, l'apoptose ainsi que l'adhésion.

Myc est impliqué dans l'initiation de nombreux cancers. Son niveau d'expression est d'ailleurs anormalement élevé dans plus de 70% des tumeurs humaines. (Claassen and Hann, 1999 ; Cole and Cowling, 2008 ; Nesbit *et al.*, 1999). En effet, la dérégulation de son expression est associée à la progression tumorale : forte prolifération cellulaire

(Facchini and Penn, 1998), angiogenèse (Baudino, 2002), réduction de l'adhésion cellulaire (Coller *et al.*, 2000) ou encore instabilités génomiques (Felsher and Bishop, 1999).

Dans les cellules quiescentes, Myc est quasiment indétectable. Sous l'action de signaux de prolifération ou mitogènes, l'expression de Myc augmente considérablement, avec notamment un pic lors de la transition G0→G1 (Bouchard *et al.*, 2004).

Myc est responsable de la régulation, négative ou positive, d'au moins 11% du génome humain. Parmi ses cibles, on compte notamment des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire, des ligands et récepteurs appartenant à différentes voies de signalisation (FGF4), des protéines structurales, des protéines ribosomiques ou impliquées dans la traduction, des protéines impliquées dans l'apoptose, des enzymes du remodelage épigénétique (Histone déacétylase 3), différents facteurs de transcription (HIF1), ainsi que les histones H2 et H4 (Fernandez *et al.*, 2003).

Les cellules ES ont une régulation atypique du cycle cellulaire sous l'effet de Myc, caractérisée par une phase G1 abrégée et au contraire une phase S prolongée (50 à 60 % du temps du cycle). Au niveau de la masse interne du blastocyste, les cellules ES subissent des cycles de division extrêmement courts (Stead *et al.*, 2002). La régulation de cette prolifération est indépendante de l'action d'agents mitogènes externes mais dépend d'un programme intrinsèque, rapprochant ainsi les cellules souches des cellules tumorales. En effet, dans les cellules ES contrairement aux cellules somatiques, la stimulation de la voie Ras/Mek/Erk par les mitogènes conduit à la différenciation cellulaire plutôt qu'à la progression du cycle cellulaire (Burdon *et al.*, 1999 ; Ying *et al.*, 2008). En plus de son rôle majeur dans la prolifération cellulaire, Myc intervient dans les modifications épigénétiques associées au maintien de la pluripotence et l'inhibition de la différenciation. Ce rôle sera abordé dans la partie II.3 sur la régulation épigénétique de la pluripotence.

En ce qui concerne sa structure, Myc est une protéine de 439 acides aminés caractérisée par la présence de 5 domaines distincts. Alors que l'activité transcriptionnelle est portée par trois domaines de type Mycbox I, II et III, la fixation à l'ADN cible est permise grâce à trois domaines situés en position C-terminale : une région basique, un domaine de type hélice-boucle-hélice et un domaine "Leucine Zipper".

Myc n'est jamais retrouvé seul *in vivo* mais associé à son partenaire transcriptionnel Max (Myc-Associated factor-X), grâce à l'interaction des domaines hélice-boucle-hélice des deux protéines. Le complexe Myc/Max reconnaît spécifiquement un motif hexamérique de la famille des E-box, CACGTG (Blackwood and Eisenman, 1991 ; Blackwood *et al.*, 1992). Cette association est indispensable pour l'interaction avec ses promoteurs cibles.. En binôme avec Max, il forme ainsi un complexe activateur de la transcription. Le duo Myc/Max peut s'associer à un autre facteur de transcription, Miz-1 (Myc interacting zinc protein 1), les trois facteurs forment alors un complexe répresseur de la transcription. (Adhikary and Eilers, 2005 ; Amati *et al.*, 1992).

Myc agit de manière très particulière au niveau des promoteurs cibles. Contrairement à la plupart des facteurs de transcription, il n'intervient pas dans la formation du complexe d'initiation de la transcription mais agit sur la libération de l'ARN Polymérase II : au niveau des gènes activés, il déclenche la libération de la polymérase et permet ainsi l'initiation de l'élongation des transcrits. Au niveau des gènes réprimés, Myc bloque cette libération. Cette répression conduit à l'accumulation d'ARN Polymérase II au niveau de ces régions promotrices. Ce processus est notamment observé au niveau des gènes *gadd45a* et *gadd153*, codant pour deux protéines antiprolifératives (Barsyte-Lovejoy *et al.*, 2004 ; Eberhardy and Farnham, 2001, 2002).

6. Lin28a

Bien qu'il ne s'agisse pas d'un facteur de transcription à proprement parler, Lin28a, ou "Lin28 Homolog A" ou encore Lin28, occupe également une place importante dans le réseau transcriptionnel des cellules ES. Il s'agit d'une protéine de 209 acides aminés, comprenant plusieurs domaines caractéristiques des protéines interagissant avec les ARN : un domaine CSD, pour "Cold Shock Domain", constitué de tonneaux beta en position N-terminale et deux domaines à doigt de zinc de type CCHC, en position C-terminale (Moss *et al.*, 1997).

Avec son paralogue Lin28b, Lin28a inhibe la maturation des miARNs de la famille *let-7*, notamment chez les cellules ES (Viswanathan *et al.*, 2008). Cette famille *let-7*, la première découverte chez l'homme, est connue pour assurer un rôle anti-oncogénique, notamment en régulant négativement l'expression de protéines impliquées dans la régulation du cycle

cellulaire, tels que des oncogènes Ras (Johnson *et al.*, 2005), Hmga2 (Yu *et al.*, 2007a), c-Myc (Sampson *et al.*, 2007) ou encore Cdk1 (Chang *et al.*, 2012).

En ce qui concerne sa maturation, *let-7* est d'abord synthétisé sous la forme d'un transcrit primaire (*pri-let-7*) puis pris en charge par Drosha au niveau nucléaire (Heo *et al.*, 2012). Une fois clivé par cette enzyme, le précurseur généré, *pre-let-7*, est exporté au niveau cytoplasmique par l'Exportine (Yi *et al.*, 2003), où il est enfin clivé par l'enzyme Dicer pour générer le miARN final. Lin28 exerce son action inhibitrice sur la maturation de *let-7* en intervenant à la fois sur la forme primaire (Newman *et al.*, 2008) et sur le précurseur (Hagan *et al.*, 2009 ; Heo *et al.*, 2008). Alors que Lin28b est retrouvé principalement dans le noyau, Lin28a occupe majoritairement une localisation cytoplasmique (Piskounova *et al.*, 2011).

Lin28a intervient également dans la régulation de la traduction des ARN messagers de par son association à différents facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction et à d'autres protéines ribosomiques (Jin *et al.*, 2011 ; Polesskaya *et al.*, 2007). Il active ainsi la traduction de nombreuses protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (Li *et al.*, 2012 ; Xu *et al.*, 2009), mais aussi des peptides ribosomiques chez les cellules ES humaines, lui conférant également un rôle de régulateur important pour la croissance et la survie des cellules ES (Peng *et al.*, 2011).

Enfin, Lin28a joue un rôle majeur dans le métabolisme des cellules ES chez les mammifères. Bien que dépendant en partie de la respiration mitochondriale oxydative, le métabolisme des cellules ES repose principalement sur un mécanisme de glycolyse aérobie, appelé effet Warburg, afin d'assurer leur prolifération soutenue (Shyh-Chang *et al.*, 2013). Lin28a active de nombreux acteurs de la cascade de signalisation Insuline-PI3K-mTOR, une nouvelle fois via le blocage de *let-7*, conduisant au final à une augmentation de la glycolyse (Zhu *et al.*, 2011).

Au sein des cellules ES, l'expression de Lin28a est activée grâce au noyau central OSN associé à un quatrième facteur, Tcf3 (Transcription Factor 3). Nous avons vu précédemment que Lin28 bloquait la maturation des miARN de la famille *let-7*. Or, il a été proposé que l'un des membres de la famille *let-7*, à savoir *let-7g*, bloquait la traduction du transcrit Lin28. Il existe ainsi une boucle complexe de régulation de l'auto-renouvellement des cellules ES. Un blocage de la maturation de *let-7g* par Lin28 permet l'auto-

renouvellement des cellules ES, en revanche, l'inhibition de l'expression de Lin28 et de certains autres gènes de pluripotence tels que Sall4 (Spalt-like transcription factor 4) et Myc est associée à la différenciation des cellules pluripotentes. En réprimant la maturation des miARN de la famille *let-7*, Lin28a participe activement au maintien de la pluripotence. La différenciation des cellules ES est ainsi accompagnée d'une diminution significative de l'expression de Lin28 (Marson *et al.*, 2008 ; Melton *et al.*, 2010).

En résumé, le maintien de la pluripotence est assuré par un réseau transcriptionnel complexe impliquant différents facteurs de transcription interconnectés. Ces facteurs de transcription permettent de maintenir l'auto-renouvellement et le phénotype indifférencié des cellules en activant l'expression des gènes de pluripotence et réprimant l'expression des gènes développementaux. La dérégulation de l'un de ces acteurs entraîne la différenciation des cellules souches pluripotentes (Figure 6).

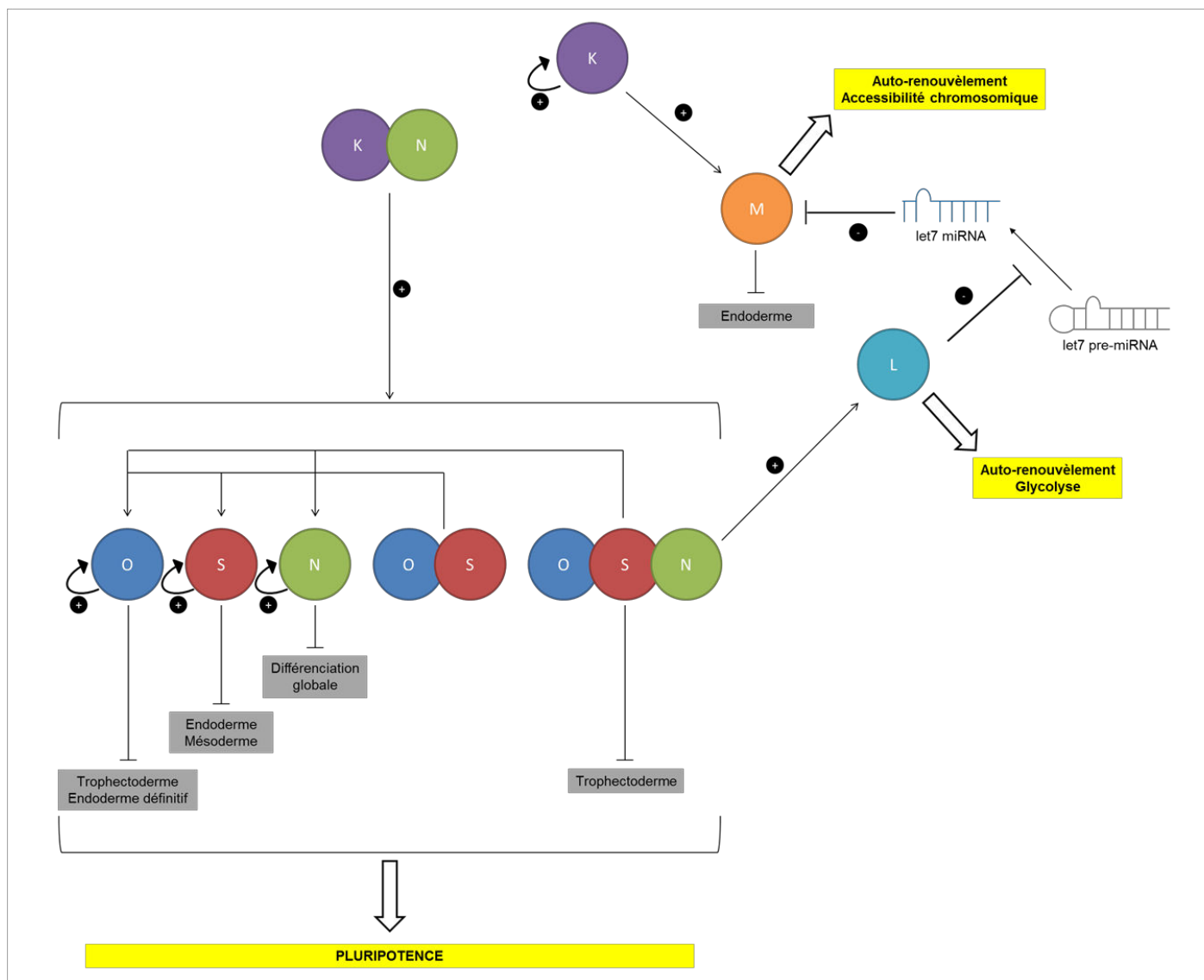


Figure 6. Schéma simplifié des interactions entre les différents acteurs du maintien de la pluripotence et de l'auto-renouveau des cellules ES. (K : Klf4, L : Lin28a, M : Myc, N : Nanog, O : Oct4, S : Sox2).

II. Régulation épigénétique

Comme dans tous les types cellulaires, la régulation de l'expression génique au sein des cellules ES est en grande partie dépendante de modifications épigénétiques (Lorch *et al.*, 1987). Ces modifications interviennent au niveau de l'ADN et des histones et permettent de modifier le niveau de compaction de la chromatine (Brownell *et al.*, 1996). Une structure décompactée permet la fixation du complexe activateur de la transcription au niveau des régions promotrices des gènes cibles. En revanche, une structure compactée est réfractaire à l'initiation de la transcription.

Les cellules ES sont caractérisées par l'expression de gènes de pluripotence et au contraire la répression de gènes tissu-spécifiques ou somatiques. Au cours du développement embryonnaire et de la différenciation cellulaire, ce profil tend à s'inverser en même temps que le paysage épigénétique des cellules (Figure 7).

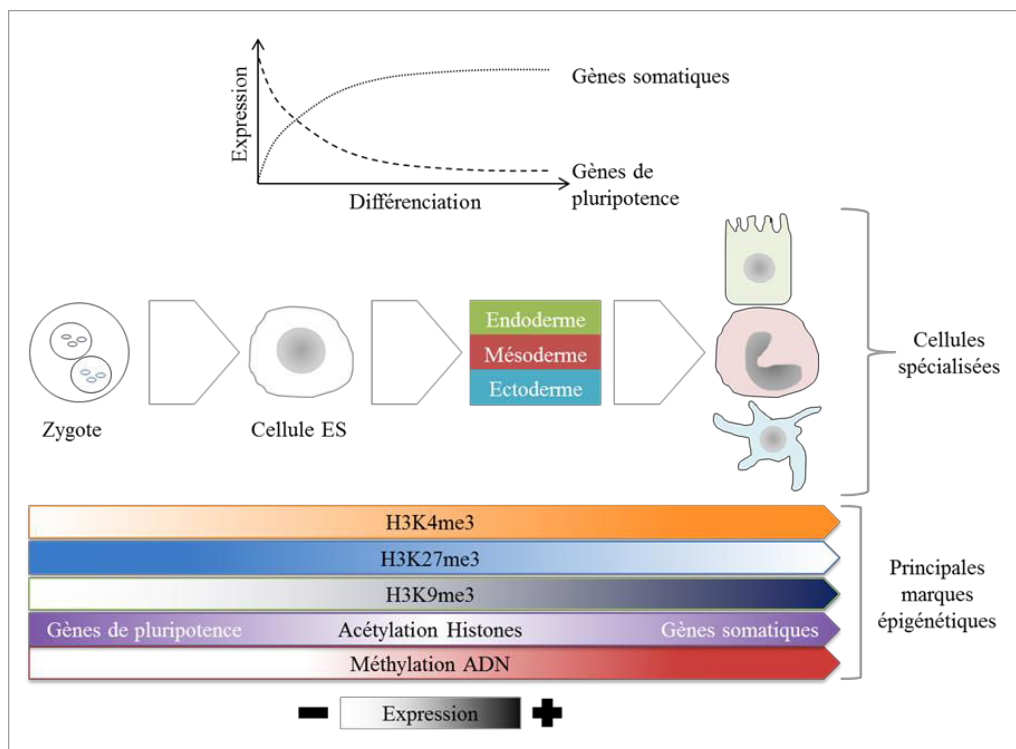


Figure 7. Evolution des marques épigénétiques principales au cours de l'embryogénèse. H3 : histone H3 ; K4, K27, K9 : résidus lysine n°4, 27 et 9 ; me3 : tri-méthylation (inspiré de Reik, 2007).

Ce remodelage épigénétique est associé à des enzymes, agissant principalement au niveau des histones ou de l'ADN. Le recrutement de ces régulateurs de la chromatine est en partie assuré par les facteurs de transcription présents au niveau des régions promotrices des gènes (Roeder, 2005).

1. Marques épigénétiques des histones

Les modifications épigénétiques réalisées au niveau des protéines histones sont l'œuvre de deux familles d'enzyme : les Histone méthyltransférases (HMT) catalysant la méthylation des histones et les Histone acétyltransférases (HAT) catalysant l'ajout d'un groupement acétyle.

i. Méthylation

Au niveau des histones, on retrouve principalement des di (me₂) ou tri-méthylation (me₃) de résidus lysine, activatrices (H3K4me₂, H3K4me₃, H3K79me₂, H3K79me₃) ou répressives (H3K9me₂, H3K9me₃, H3K27me₃). Les méthylations des histones sont des marques épigénétiques réversibles (Hu and Rosenfeld, 2012 ; Reik, 2007 ; Young, 2011) (Tableau 4). Les cellules ES sont également caractérisées par la présence de domaines de chromatine bivalents, comprenant les marques H3K4me₃ activatrice et H3K27me₃ répressive. Ces domaines seraient associés à des gènes développementaux faiblement exprimés au sein des cellules ES, et dont l'expression serait favorisée au cours du développement par le retrait de la marque inhibitrice. Cette configuration permet une activation rapide du gène (Bernstein *et al.*, 2006).

ii. Acétylation

L'acétylation des histones sur les résidus lysine est une modification épigénétique activatrice de la transcription. Elle induit une neutralisation de la charge positive des protéines histones, diminuant l'interaction ADN/histone, favorisant ainsi la formation du complexe d'initiation de la transcription (Tableau 4).

Il s'agit d'une des marques épigénétiques majeures gouvernant l'expression des gènes de pluripotence. En effet, il a été montré que les régions promotrices des gènes *nanog*, *oct4* ou encore *rex1* étaient hyper acétylées au sein des cellules ES. Au contraire, une

différenciation cellulaire est associée à une perte de cette marque épigénétique (Saraiva, 2010).

Tableau 4. Aperçu des marques épigénétiques principales retrouvées au sein des cellules ES et cellules somatiques.

			Cellule ES		Cellule somatique	
Cible	Marque épigénétique	Fonction	Gène de pluripotence	Gène somatique	Gène de pluripotence	Gène somatique
HISTONES	H3K4me2	activatrice				✓
	H3K4me3	activatrice	✓	✓		✓
	H3K9me2	répression		✓		
	H3K9me3	répressive		✓	✓	
	H3K27me3	répressive	✓	✓		
	H3K79me2	activatrice	✓			✓
	H3K79me3	activatrice				✓
	Acétylation	activatrice	✓			✓
ADN	Méthylation	répression permanente			✓	

2. Marques épigénétiques de l'ADN

La principale marque épigénétique gouvernant la pluripotence directement associée à l'ADN est la méthylation qui est un processus induisant une inactivation permanente de l'expression des gènes de pluripotence (Tableau 4).

Elle intervient de manière relativement tardive au cours de l'embryogénèse. Les enzymes impliquées dans la méthylation de l'ADN sont les ADN Méthyltransférase (DNMT). Alors que les enzymes DNMT3a et DNMT3b sont impliquées dans la mise en place de nouvelles marques de méthylation, on parle de méthylation *de novo*, l'enzyme DNMT1 (Howell *et al.*, 2001) permet le maintien des marques de méthylation parentales (Howell *et al.*, 2001 ; Okano *et al.*, 1999). La méthylation est réalisée au niveau de séquences riches en CG, on parle d'îlots CpG.

3. Importance de l'épigénétique dans le maintien de la pluripotence

Les marques épigénétiques spécifiques des cellules pluripotentes sont en grande partie régulées par les facteurs de transcription embryonnaires et par Myc. Il existe ainsi une véritable régulation croisée au sein des cellules ES, entre modifications épigénétiques et activité transcriptionnelle.

i. Myc est un acteur majeur des modifications épigénétiques propres aux cellules ES

a. Myc dicte les capacités de prolifération des cellules ES

En interagissant avec TRRAP (Transformation/Transcription-Associated Protein), Myc induit l'acétylation des histones H3 et H4. Par ce biais, Myc est notamment responsable de l'activation de l'expression de la Cycline D2, impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et de TERT (Telomerase Reverse Transcriptase), assurant le maintien de la longueur des télomères. Ainsi, Myc stimule la division et participe au maintien des capacités prolifératives des cellules pluripotentes (Bouchard, 2001 ; Frank *et al.*, 2001 ; Nikiforov *et al.*, 2002).

b. Inhibition de la différenciation des cellules

L'activation de *myc* est essentielle au maintien de la pluripotence. Une diminution considérable de l'expression de *myc* est d'ailleurs associée à la différenciation endodermique des cellules ES, ce qui s'explique par une augmentation de l'expression de GATA6, normalement réprimée par Myc (Cartwright, 2005 ; Smith *et al.*, 2010).

Cette répression de la différenciation est liée au maintien de la marque épigénétique inhibitrice H3K27me3 (tri-méthylation de l'Histone 3 au niveau du résidu Lysine 27) que réalise le complexe PCR2 (Polycomb Repressive Complex 2), lui-même activé par Myc (Azucara *et al.*, 2006). Ainsi, dans les cellules ES, Myc réprime l'expression des gènes impliqués dans la différenciation en tissu extra embryonnaire (*esx1l*), endoderme (*onecut1*), mésoderme (*hand1*) et ectoderme (*hoxb1*). Il est important de noter que cette marque est absente des gènes activés sous la dépendance d'Oct4, Sox2 et Nanog, qui sont

actifs au sein des cellules ES (*zic3*, *stat3*, *oct4*, *nanog*) (Lee *et al.*, 2006b ; Neri *et al.*, 2012).

c. Maintien du réseau transcriptionnel de pluripotence

L'action épigénétique de Myc au niveau des promoteurs cibles via l'interaction avec TRRAP, plateforme d'ancrage des HAT, induit une décompaction de l'ADN au niveau des gènes actifs. Récemment, des travaux ont démontré que la délétion du gène *trrap* au sein des cellules ES murines conduisait à une forte diminution de l'expression des trois facteurs centraux Oct4, Sox2 et Nanog, accompagnée d'une différenciation, associée à perte de l'acétylation de Histones H3 et une augmentation de la marque H3K27me3. De plus, les auteurs ont démontré la proximité de TRRAP et Oct4 au niveau des promoteurs des gènes *pou5f1*, *sox2* et *nanog*, mais pas au niveau des gènes tissu-spécifiques (Sawan *et al.*, 2013). Enfin, Myc favorise l'activité transcriptionnelle des facteurs centraux OSN en recrutant de nombreuses HAT au niveau de leurs promoteurs cibles.

Myc semble donc, notamment via le recrutement de HAT, favoriser l'expression des facteurs de transcription centraux du réseau de pluripotence OSN ainsi que l'accès de ces facteurs à leurs promoteurs cibles (Martinato *et al.*, 2008).

ii. Les facteurs centraux OSN sont également impliqués dans la mise en place de marques épigénétiques

Les facteurs Oct4, Sox2 et Nanog participent également à la mise en place de marques épigénétiques responsables du maintien de la pluripotence. Tous les trois, ils recrutent des régulateurs tels que le complexe PCR2, responsable de la mise en place de la méthylation répressive H3K27me3 au niveaux de gènes développementaux tels que *gata2*, *gata3* ou *sox17* (Lee *et al.*, 2006b). En association avec Nanog, Oct4 participe au recrutement de la déacétylase NODE (Nanog and Oct4-associated DEacetylase), assurant l'effacement de l'acétylation activatrice des histones au niveau des régions promotrices de gènes du développement (Liang *et al.*, 2008). Enfin, Oct4 seul semble permettre le recrutement de la HMT SETDB1 au niveau de gènes impliqués dans la différenciation trophoblastique, induisant la tri-méthylation de la lysine 9 au niveau de l'histone H3 (H3K9me3), bloquant ainsi l'expression de ces gènes (Yuan *et al.*, 2009).

CHAPITRE 3

Génération d'iPS

Comme indiqué précédemment les cellules souches pluripotentes induites sont obtenues par la surexpression de facteurs de transcription exogènes au sein de cellules somatiques. Cette technologie permet d'avoir accès à des cellules souches pluripotentes humaines sans avoir à utiliser d'embryon. La possibilité de reprogrammer des cellules adultes par cette technologie permet d'envisager de nombreuses applications en recherche et thérapie.

Dans ce chapitre, nous allons aborder les différentes techniques permettant de générer des iPS, les différentes applications de ces cellules ainsi que les caractéristiques des iPS en fonction de la méthode choisie. Un aperçu des grands mécanismes moléculaires sous-jacents à ce processus de reprogrammation par surexpression de certains facteurs de transcription sera également présenté.

I. Les grands mécanismes du processus de reprogrammation cellulaire par induction

Le processus de reprogrammation cellulaire est associé à une multitude d'évènements moléculaires permettant la dédifférenciation de cellules somatiques en cellules souches. Il est notamment caractérisé par une transition entre plusieurs phases, associées à une modification du paysage épigénétique des cellules, permettant une expression différentielle des gènes. Ces dernières années, plusieurs équipes ont cherché à mettre en évidence ces différents mécanismes, la plupart des travaux ayant été réalisés sur des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF).

Bien que différents modèles aient été proposés, il semblerait que le processus de reprogrammation puisse être décomposé en trois grandes phases bien distinctes : une phase d'initiation stochastique, une phase de transition appelée également phase de maturation, puis une phase de stabilisation ou phase déterministe (Figure 8). Alors que les processus cellulaires sont dictés par les facteurs de transcription exogènes au cours des deux premières phases, les cellules en phase de stabilisation possèdent un réseau de régulation transcriptionnel indépendant des facteurs exogènes (Buganim *et al.*, 2013 ; David and Polo, 2014).

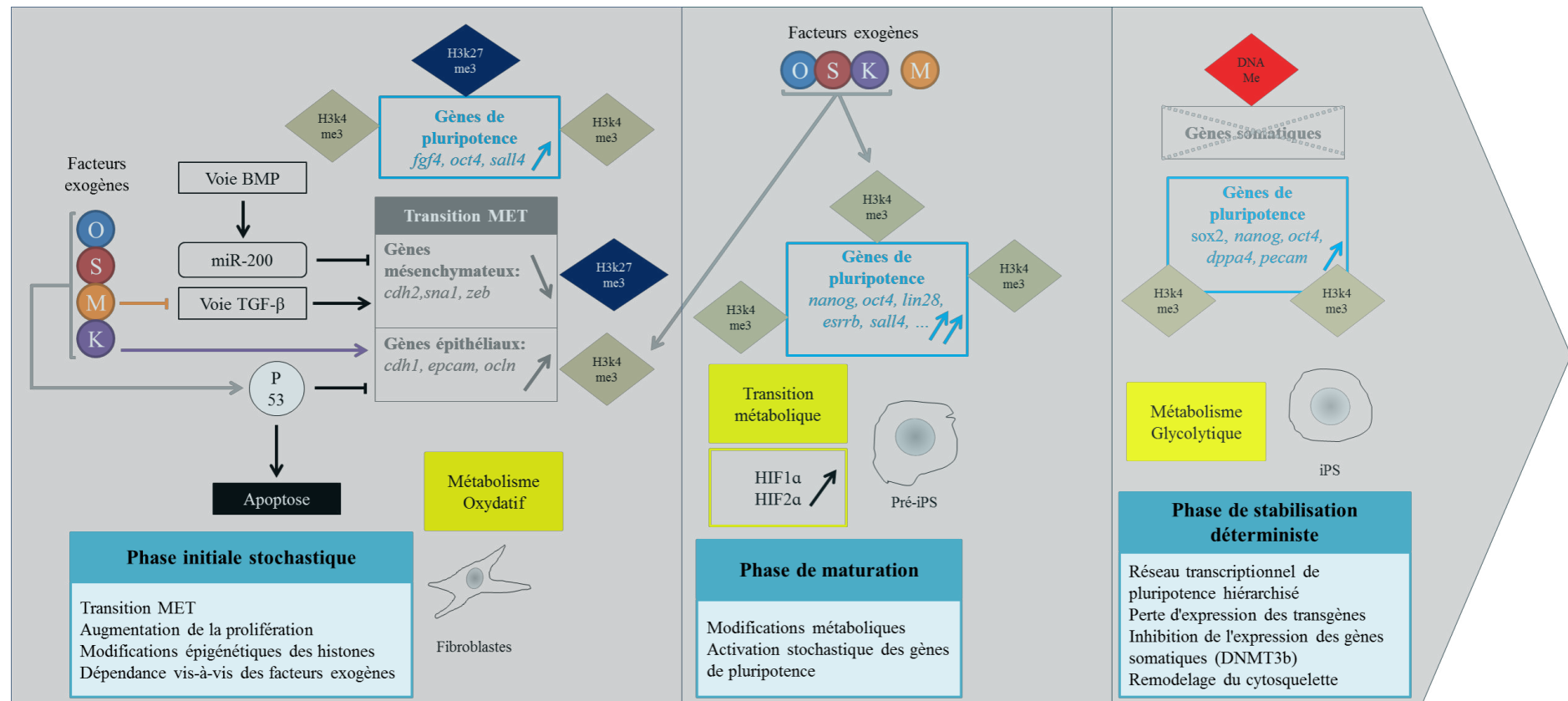


Figure 8. Aperçu des différentes phases de la reprogrammation. BMP (Bone Morphogenetic Progenitor), DNA me (Méthylation de l'ADN), *dppa4* (developmental pluripotency associated 4), *epcam* (epithelial cell adhesion molecule), *esrrb* (estrogen related receptor, beta), *fgf4* (fibroblast growth factor 4), HIF (Hypoxia-Inducible Factors), MET : transition mésenchymo-épithéliale, *pecam* (platelet/endothelial cell adhesion molecule), *cdh2* (Cadherin-2), *ocln* (occludin), *sall4* (spalt-like transcription factor 4), *sna1* (zinc finger protein snail), TGF-β (Transforming Growth Factor β), *zeb* (zinc finger E-box binding homeobox).

1. La phase d'initiation stochastique

La phase d'initiation est caractérisée par une transition mésenchymo-épithéliale (MET) induisant des changements épigénétiques et de morphologie des cellules (Shu and Pei, 2014).

Elle est associée à la mise en place de la marque épigénétique répressive H3K27me3 et une diminution de la marque activatrice H3K4me3 au niveau des gènes du mésenchyme tels que *snail*, *zeb* et *cdh2* (Sridharan *et al.*, 2009). Cette tendance est inversée au niveau des gènes épithéliaux mais aussi des gènes de pluripotence. Oct4 serait à l'origine de la mise en place de la marque H3K4me3 via le recrutement de l'enzyme WDR5 (Ang *et al.*, 2011) ; le trio OSK, via le recrutement de la déméthylase Utx au niveau des promoteurs cibles, permettrait le retrait de la marque répressive H3K27me3 (Mansour *et al.*, 2012).

Myc et Klf4 jouent un rôle primordial au cours de cette première phase. Myc facilite l'accès d'OSK à leurs promoteurs cibles (Soufi *et al.*, 2012) et empêche l'activation des gènes mésenchymateux en bloquant en plus la voie du TGF- β (Li *et al.*, 2010 ; Liao *et al.*, 2011). Klf4 est quant à lui capable d'activer directement l'expression des gènes épithéliaux tel que *cdh1* (Soufi *et al.*, 2012).

La voie BMP (Bone Morphogenetic Proteins) semble également impliquée dans cette transition via l'activation de miARN tel que miR-200, réprimant également l'expression des gènes spécifiques du mésenchyme (Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010).

Cette phase initiale est également associée à une induction de gènes associés aux voies de l'apoptose. En effet, il a été montré que OSKM étaient capables d'induire l'expression de p53 et p19, dès 48h après le début de la reprogrammation. En plus d'être un acteur central de l'apoptose, p53 est un frein à la reprogrammation puisqu'il inhibe l'expression des gènes épithéliaux (Soufi *et al.*, 2012).

Parmi les trois phases de la reprogrammation, cette phase initiale stochastique est certainement celle au cours de laquelle la cellule subit le plus de modifications de sa signature transcriptomique. Bien que cette voie soit initiée dans la plupart des cellules, chaque cellule subit des événements moléculaires très différents, conduisant à des issues très diverses lui permettant ou non de passer à l'étape de maturation.

2. Phase de maturation

Alors que le processus d'initiation est induit dans la plupart des cellules, le passage en phase de maturation est l'étape critique du processus de reprogrammation. Il est associé à la mise en place du réseau de pluripotence grâce à une activation progressive des gènes associés tels que *nanog*, *oct4*, *sall4* ou encore *lin28a*. Cette activation transcriptionnelle est permise par la poursuite de la mise en place des marques épigénétiques H3K4me3/H3K27me3 initiée lors de la phase stochastique (Polo *et al.*, 2012).

Contrairement à la phase initiale au cours de laquelle les facteurs de reprogrammation Myc et Klf4 semblaient être les régulateurs principaux, les événements moléculaires observés au cours de cette phase de maturation sont principalement sous le contrôle d'Oct4, Sox2 et Klf4 (Polo *et al.*, 2012).

Il est important de noter qu'il est possible pour les cellules se trouvant à ce stade, de retourner à l'état somatique. Le rôle de Lin28a dont l'expression est induite au cours de la reprogrammation serait d'empêcher ce retour en arrière (Tanabe *et al.*, 2013).

Cette phase est également caractérisée par un switch métabolique. En effet, comme nous l'avons abordé précédemment, les cellules souches pluripotentes présentent un métabolisme principalement glycolytique, contrairement aux cellules somatiques utilisant principalement la phosphorylation oxydative. Ce changement métabolique est assuré par l'expression des "Hypoxia-inducible Factors" HIF1 α et HIF2 α , contrôlant l'ensemble des acteurs de ce type de glycolyse (Mathieu *et al.*, 2014). Il a également été montré que HIF2 α jouait un rôle important dans la pluripotence en activant l'expression d'Oct4 (Covello *et al.*, 2006).

L'objectif final de cette phase de maturation est de préparer la transition vers la phase de stabilisation, caractérisée par une régulation transcriptionnelle indépendante des facteurs de transcription exogènes. Pour cela, les cellules doivent atteindre un état transcriptomique particulier, on parle de cellules compétentes pour la stabilisation, au sein desquelles des protéines impliquées dans la prolifération (Arid3b) ou le remodelage de la matrice extracellulaire (Mmrn2) sont fortement exprimées (Golipour *et al.*, 2012).

3. Phase de stabilisation

La phase de stabilisation correspond à la fin du processus de reprogrammation. Cette phase est atteinte seulement par une partie des cellules en cours de reprogrammation, ayant acquis une compétence transcriptionnelle particulière.

Elle est caractérisée par la mise en place d'un réseau de régulation différent de celui observé lors de la phase de maturation, dit réseau transcriptionnel cœur, comparable à celui observé au sein des cellules ES. Ce réseau hiérarchique ou déterministe, comprend notamment le cœur constitué d'Oct4, Nanog et Sox2. On retrouve également la DNMT3b, responsable de méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs des gènes somatiques, permettant d'éteindre leur expression. Enfin, on observe également au cours de cette phase la réexpression de la télomérase permettant l'allongement des télomères ainsi que la réactivation du chromosome X inactif, le cas échéant (Stadtfield *et al.*, 2008a).

A ce stade, les facteurs exogènes ne sont plus exprimés. Il a d'ailleurs été montré que la persistance de l'expression des transgènes au cours de la maturation bloquait la transition vers cette phase. Ainsi seuls les facteurs de transcription endogènes gouvernent l'auto-renouvellement et le phénotype pluripotent des cellules (Hansson *et al.*, 2012 ; Polo *et al.*, 2012).

II. Différentes méthodes de génération d'iPS

Il existe à l'heure actuelle de nombreuses méthodes permettant de générer des iPS. Cependant les efficacités et les niveaux de sécurité de chacune d'entre elles sont très variables. Plusieurs paramètres entrent en compte dans l'élaboration d'une méthode de génération d'iPS, en fonction des applications finales des cellules reprogrammées : le type de vecteur de reprogrammation, le choix des facteurs de transcription ainsi que la source de cellules à reprogrammer.

1. Différents systèmes de reprogrammation

Historiquement, les vecteurs rétroviraux font référence, avec les publications des premiers travaux de l'équipe de Yamanaka en 2006 et 2007. Depuis, de nombreux protocoles basés sur l'utilisation de différents types de vecteurs ont vu le jour. On peut globalement diviser ces méthodes de reprogrammation en deux catégories : la reprogrammation avec et sans transfert de matériel génétique. On trouve dans la première catégorie des vecteurs intégratifs et non intégratifs, dans la seconde des vecteurs de protéines mais aussi des méthodes de reprogrammation sans vecteur basées sur des molécules chimiques.

i. Reprogrammation par transfert d'acides nucléiques

La plupart des vecteurs utilisés à ce jour repose sur l'apport de séquences d'acides nucléiques, sous forme d'ADN ou d'ARN codant pour les facteurs de transcription embryonnaires ou réprimant certaines voies inhibitrices de l'expression endogène de ces facteurs et de la mise en place du réseau de régulation de la pluripotence.

a. Les vecteurs intégratifs

Les vecteurs intégratifs ont, comme leur nom l'indique, la capacité de s'intégrer au sein du génome cible. Cette famille comprend les vecteurs rétroviraux, les vecteurs lentiviraux ainsi que les transposons. Les caractéristiques de ces vecteurs ainsi que leur efficacité maximale sont présentées dans le Tableau 5.

Tableau 5. Caractéristiques des principaux vecteurs intégratifs pour la reprogrammation cellulaire.
Les efficacités indiquées ont été obtenues sur des fibroblastes humains (sauf exceptions), avec la combinaison OSKM et en l'absence de tout additif chimique favorisant le processus de reprogrammation.

Catégorie	Type	Avantages	Inconvénients	Efficacité maximale (référence)
Rétroviral	Rétroviral monocistronique	- Forte expression du transgène - Systèmes inductibles disponibles	- Intégration génomique - Persistance de l'expression du transgène - N'infecte que les cellules en division	0,02% (Takahashi <i>et al.</i> , 2007)
	Rétroviral polycistronique	- Réduction du nombre d'intégration - Expression des transgènes à partir d'un même promoteur	- Persistance de l'expression du transgène - Efficacité réduite	0,012% (Rodríguez-Pizà <i>et al.</i> , 2009)
Lentiviral	Lentiviral monocistronique	- Avantage des vecteurs rétroviraux - Infecte les cellules quiescentes - Tropisme large	- Intégration génomique - Réactivation du transgène	0,5% (Schlaeger <i>et al.</i> , 2014)
	Lentiviral polycistronique	- Réduction du nombre d'intégrations - Expression des transgènes à partir d'un même promoteur	- Intégration génomique - Persistance de l'expression du transgène - Très peu efficace	0,0004% (souris) (Chang <i>et al.</i> , 2009)
	Lentiviral polycistronique inductible	- Contrôle temporel de l'activation des transgènes - Efficacité supérieure aux vecteurs polycistroniques	- Intégration génomique - Peu efficace	0,002% (Maherali <i>et al.</i> , 2008)
	Lentiviral polycistronique inductible excisable	Contrôle temporel de l'activation des transgènes	Persistance d'empreintes loxP dans le génome hôte	0,05% (Awe <i>et al.</i> , 2013)
Transposons	Transposons piggy bac	- Excision du transgène - Site d'insertion non modifié après excision	- Intégration génomique - Pas de contrôle de l'expression	0,07% (souris) (Yusa <i>et al.</i> , 2009)
	Transposons piggy bac inductibles	Contrôle temporel de l'expression des transgènes	Intégration génomique	48 colonies (Woltjen <i>et al.</i> , 2009)

◆ *Vecteur rétroviraux et lentiviraux*

Les plus utilisés à ce jour sont les vecteurs rétroviraux et lentiviraux, de par leur efficacité et leur facilité d'utilisation. Les vecteurs rétroviraux sont généralement dérivés des virus MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus), les vecteurs lentiviraux du VIH. Contrairement aux virus à partir desquels ils sont issus, ils sont incapables de se répliquer au sein des cellules infectées. Ces vecteurs viraux présentent des capacités de clonage considérables, de 6 à 8 kb pour les vecteurs rétroviraux et de 8 à 10 kb pour les vecteurs lentiviraux. Les séquences nucléotidiques insérées au sein de ces vecteurs sont la plupart du temps associées à des promoteurs d'expression très forts tels que SV40, CMV, CMG ou EF1A, permettant une expression très forte du transgène au sein des cellules (González *et al.*, 2011).

Grâce à ce type de vecteur, de nombreux protocoles de reprogrammation de cellules humaines ont été réalisés, les efficacités de reprogrammation pouvant atteindre 0,05%. Nous verrons plus tard dans ce chapitre que les efficacités de reprogrammation sont étroitement liées aux facteurs de transcription utilisés, aux cellules reprogrammées et à certains autres paramètres.

L'intégration génomique du virus est permise grâce à des séquences LTR (Long Terminal Repeats) situées aux extrémités 5' et 3' des gènes du virus (Figure 9A). Ces LTR permettent une intégration aléatoire dans le génome hôte, au niveau de séquences présentant des homologies dans les régions non codantes en 5' et 3' des gènes eucaryotes (Temin, 1982).

Les efficacités maximales de reprogrammation de fibroblastes humains sont de 0,02% pour des vecteurs rétroviraux et de 0,5% pour des vecteurs lentiviraux (Schlaeger *et al.*, 2014 ; Takahashi *et al.*, 2007). L'efficacité supérieure des vecteurs lentiviraux serait liée à une extinction plus lente de l'expression des transgènes, en plus de la capacité à infecter des cellules quiescentes (Stadtfield *et al.*, 2008a).

Afin de permettre une reprogrammation complète, chaque transgène doit s'intégrer au moins une fois dans le génome de la cellule hôte. En réalité, cette intégration se produit bien plus fréquemment puisque 8 copies d'un même transgène ont pu être retrouvées au sein du génome d'une cellule (Okita *et al.*, 2007 ; Takahashi *et al.*, 2007). L'intégration

génomique étant relativement fréquente avec ces vecteurs, la probabilité de voir apparaître une insertion mutagène est donc élevée.

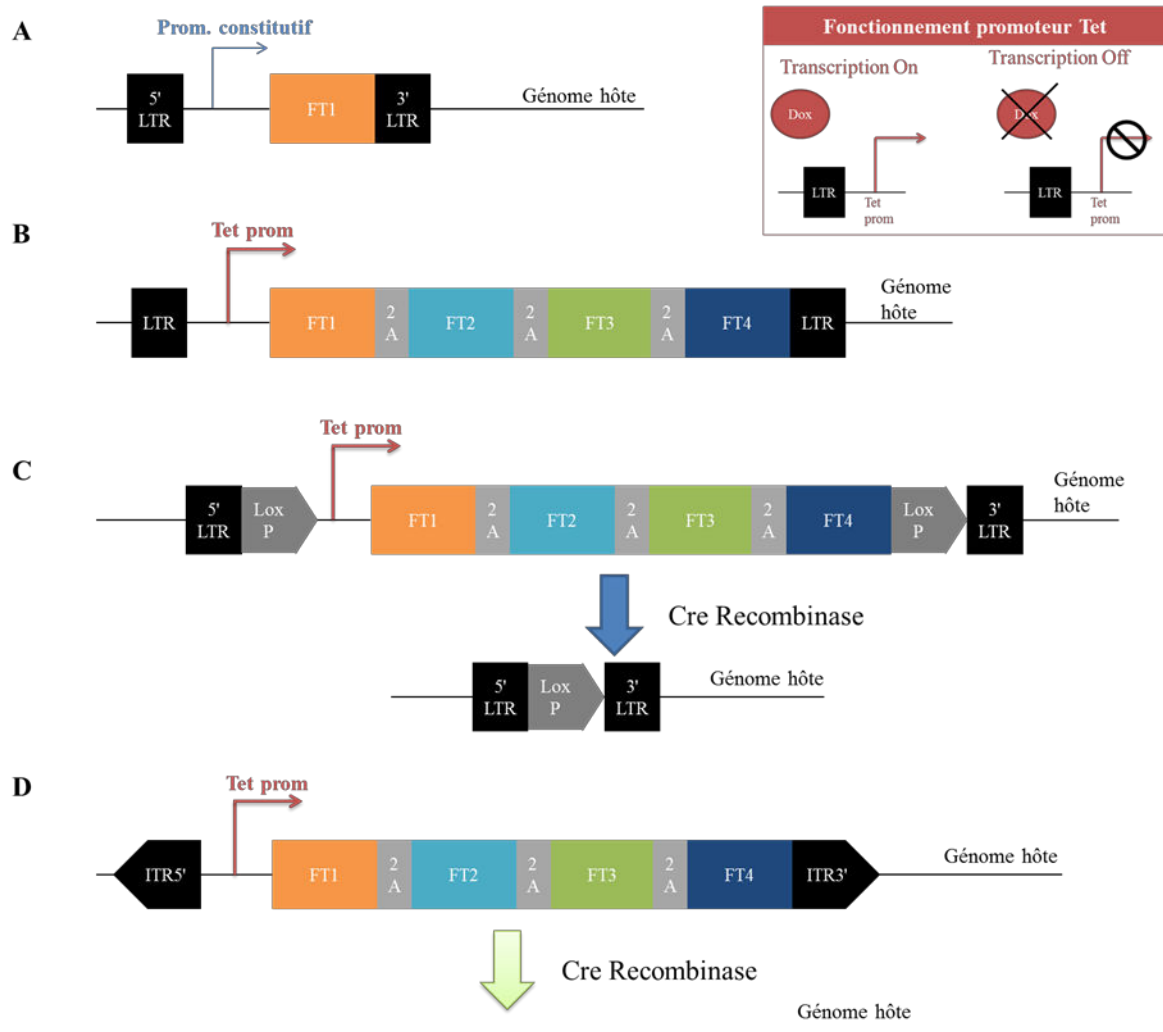


Figure 9. Représentation de l'évolution des vecteurs intégratifs pour la reprogrammation cellulaire. (A) Vecteur monocistronique. (B) Vecteur polycistronique inducible. (C) Vecteur polycistronique inducible et excisable. (D) Vecteur de type transposons Piggy Bac inducible et polycistronique. 2A : peptide 2A, Dox : doxycycline, ITR : Inverted Terminal Repeats.

◆ Vecteurs rétroviraux et lentiviraux polycistroniques

Dans l'optique de limiter le nombre d'insertions génomiques, des systèmes retro et lentiviraux polycistroniques ont vu le jour. Le principe est d'insérer les séquences nucléotidiques codant pour les facteurs de transcription sur un même vecteur. Les

séquences d'intérêt sont entrecoupées de séquences permettant la synthèse de protéines différentes à partir d'une même séquence d'ARN messenger. Les séquences IRES et le peptide 2A sont les plus utilisées pour séparer les séquences des facteurs de transcription. Les IRES (Internal ribosome entry site) sont des séquences d'ADN induisant une conformation particulière de l'ARN messenger (ARNm), permettant le recrutement du ribosome en s'affranchissant de la reconnaissance de la coiffe en 5' de l'ARN messenger. Ce type d'élément est naturellement utilisé par certains virus pour détourner la machinerie cellulaire hôte (Balvay *et al.*, 2009). Le peptide 2A permet de produire différentes protéines à partir d'un même ARN messenger. Il s'agit d'une séquence peptidique particulière à l'origine d'un mécanisme dit de "ribosome skipping", permettant la libération d'une première séquence peptidique et l'initiation de la traduction d'une seconde, sans dissociation du complexe ribosome/ARNm. Le peptide 2A est privilégié pour construire ces vecteurs polycistroniques, de par sa faible taille et une stabilité supérieure dans le niveau d'expression (Radcliffe and Mitrophanous, 2004).

Ce procédé permet ainsi de limiter l'intégration d'éléments provenant des vecteurs à une copie par génome. L'efficacité est en revanche très inférieure à celles des vecteurs monocistroniques, ce qui est certainement lié à une intégration plus faible et donc une diminution de l'expression de chaque transgène. En effet, en 2011, Rodríguez-Pizà et ses collaborateurs ont réussi à générer des iPS humaines à partir de fibroblastes adultes avec un vecteur rétroviral polycistronique portant les séquences codantes de OSKM, avec une efficacité réduite d'un facteur 2 en comparaison de vecteurs rétroviraux monocistroniques (Rodríguez-Pizà *et al.*, 2009).

◆ *Vecteurs lentiviraux polycistroniques inductibles*

Il est également bien connu que l'expression résiduelle des transgènes au sein des iPS bloque la différenciation *de novo* des cellules pluripotentes, limitant ainsi fortement le potentiel et l'intérêt des cellules pluripotentes obtenues (Ramos-Mejía *et al.*, 2012). De même il a été montré que la réactivation des transgènes pouvait se produire dans les cellules dérivées des iPS (Choi *et al.*, 2014). La réactivation du transgène constitue un problème de sécurité majeur étant donné que certains facteurs possèdent un potentiel oncogène fort, notamment c-Myc, et que le maintien de leur expression peut conduire à une transformation tumorale. L'expression résiduelle d'antigènes embryonnaires peut

également conduire à une immunogénicité des cellules injectées chez la souris (Zhao *et al.*, 2011).

Afin de répondre à ce problème, des systèmes inductibles ont vu le jour permettant de contrôler l'expression du transgène (Stadtfield *et al.*, 2008a). Des lignées cellulaires ayant intégré les différents transgènes d'intérêt sous la dépendance d'un promoteur inductible sont d'abord générées, puis l'activation de l'expression de ces transgènes est induite grâce à l'ajout d'une molécule exogène. Le promoteur le plus largement utilisé est le promoteur Tet, inductible en présence de doxycycline (Figure 9B).

Grâce à ce système, en 2008, l'équipe de Hochedlinger est parvenue à générer des iPS à partir de fibroblastes et de kératynocytes humains. En revanche, l'efficacité de reprogrammation est plus de 10 fois plus faible qu'avec des vecteurs lentiviraux (0.002% sur les fibroblastes). Cependant, le contrôle de l'expression des transgènes améliore nettement l'efficacité de reprogrammation par rapport à un vecteur lentiviral polycistronique à expression constitutive, pour lequel, d'après mes recherches bibliographiques, aucune iPS n'a été générée à ce jour à partir de cellules somatiques humaines (Maherali *et al.*, 2008).

◆ *Vecteurs lentiviraux inductibles excisables*

La manière la plus rationnelle permettant de limiter au maximum possible les problèmes liés à l'intégration des transgènes serait de pouvoir les retirer du génome hôte une fois la pluripotence établie.

C'est pourquoi une nouvelle génération de vecteurs lentiviraux polycistroniques a vu le jour, au sein desquels les transgènes sont entourés de séquences de recombinaison homologue loxP. Ces séquences sont reconnues spécifiquement par la Cre recombinase, induisant une recombinaison entre ces deux séquences, permettant d'éliminer le transgène inséré entre elles. Ces séquences de recombinaison ainsi que cette enzyme ont été découvertes chez le bactériophage P1 (Kühn and Torres, 2002). D'un point de vue pratique, une fois les iPS obtenues par induction des transgènes grâce à la doxycycline, un vecteur non intégratif adénovirus ou épisomique est utilisé pour exprimer la Cre recombinase au sein des iPS obtenues, conduisant à l'excision des transgènes (Figure 9C). Ce type de

vecteur de reprogrammation est couramment appelé STEMCCA pour "STEM Cell Cassette".

Cette technologie a été utilisée avec succès pour générer des iPS humaines débarrassées de tout transgène. L'efficacité observée lors de la reprogrammation de fibroblastes adultes humains avec la combinaison OSKM se situe entre 0,01% et 0,05%, ce qui est largement supérieur à l'efficacité associée aux vecteurs lentiviraux inductibles non excisables. De plus, 100% des clones testés ne possédaient plus la cassette lentivirale, soulignant ainsi la performance du procédé d'excision (Awe *et al.*, 2013 ; Somers *et al.*, 2010).

Ces résultats démontrent toute l'importance de retirer la cassette lentivirale du génome hôte, non seulement en termes de sécurité, mais aussi d'efficacité de reprogrammation, puisque les efficacités associées sont comparables à celles des vecteurs lentiviraux de première génération, monocistroniques, à expression constitutive et persistants dans le génome.

◆ *Les transposons*

Bien que les STEMCCA paraissent un très bon moyen de générer des iPS sans séquence exogène intégrée, l'excision au niveau des transgènes par la Cre recombinase laisse un site loxP unique, ainsi que les LTR, au niveau du site d'intégration initial. Cette empreinte loxP peut potentiellement être présente au niveau de régions promotrices de gènes importants pour la cellule, tels que des régulateurs du cycle cellulaire ou du métabolisme mais aussi des proto-oncogènes, dont la dérégulation est souvent associée à une transformation tumorale. De plus, il y existe aussi un risque de recombinaison croisée entre deux sites. Les iPS générées grâce à cette technologie comportent donc toujours un risque incompatible avec une utilisation clinique.

Un troisième type de vecteur a vu le jour, reposant sur une technologie très différente, celle des transposons. Les transposons sont des séquences d'ADN mobiles, capables de se déplacer au sein du génome par un mécanisme de "couper/coller". L'intégration est permise grâce à des séquences répétées inversées de 13 pb situées aux extrémités 5' et 3' des transposons, les "Inverted Terminal Repeats" (ITR). Une enzyme, la transposase, est capable de reconnaître ces séquences et de les exciser tout en "refermant" l'ADN

génomique (Ivics *et al.*, 2009). Il a été montré que 44% du génome humain était occupé par des transposons ou des séquences assimilées (Mills *et al.*, 2007).

Deux types de transposons sont majoritairement utilisés pour générer des vecteurs : les transposons *piggy bac*, dérivés de Lepidoptera, et les transposons *sleeping beauty*, réactivés à partir d'un fossile de poisson. Les ITR des transposons *piggy bac* sont riches en TTAA, ceux des *sleeping beauty* sont riches en TA. Contrairement aux transposons *sleeping beauty*, la recombinase associée aux transposons *piggy bac* ne laisse aucune empreinte dans le génome (Izsvak, 2004 ; Yusa, 2015).

Les vecteurs utilisant des transposons reposent sur un squelette de plasmide épisomique, non intégratif, sur lequel est insérée une cassette codant les différents facteurs de transcription, entourée des séquences ITR spécifiques. Ces vecteurs présentent des capacités de clonage de 8 à 10 kpb. Un plasmide "helper" codant la transposase est ensuite employé pour éliminer les transgènes. A ce jour, aucun protocole de génération d'iPS utilisant les propriétés des transposons Sleeping Beauty n'a été publié. En revanche, plusieurs équipes sont parvenues à générer des iPS murines et humaines à l'aide d'un vecteur *piggy bac*.

En 2009, grâce à cet outils, Yusa et ses collaborateurs ont généré des iPS à partir de fibroblastes murins avec une efficacité atteignant environ 0,07% avec la combinaison OSKM, ce qui est relativement proche des rendements obtenus avec les vecteurs lentiviraux (Yusa *et al.*, 2009).

Il existe également des versions inductibles par la doxycycline, permettant le contrôle de l'expression des transgènes, comme c'est le cas avec les vecteurs lentiviraux (Figure 9D). Ces plasmides *piggy bac* inductibles ont notamment été utilisés avec succès pour la génération d'iPS humaines. Le procédé d'excision est en revanche peu performant puisque seulement 2% des transgènes ont pu être éliminés sur 48 lignées d'iPS générées (Woltjen *et al.*, 2009).

Bien que relativement performante, la technologie des transposons, en particulier celle des *piggy bac*, ne garantit en rien la sécurité des iPS étant donné que le processus d'excision par la transposase est très peu efficace. De plus, la présence de micro-délétions,

potentiellement mutagènes, a été détectée au niveau des sites d'excisions dans 5% des cas (Wang *et al.*, 2008).

b. Les vecteurs non intégratifs

Comme nous l'avons abordé précédemment, les vecteurs intégratifs, bien que relativement efficaces, présentent un certain nombre d'inconvénients limitant fortement le potentiel d'utilisation des iPS obtenues grâce à ces méthodes. Notamment, le risque d'insertion mutagène est un problème majeur et les stratégies d'excision des transgènes ne sont pas satisfaisantes à ce jour. De nouvelles méthodes de transfert d'acides nucléiques ont alors vu le jour, reposant sur l'utilisation de vecteurs dérivés de virus en théorie non intégratifs, tels que les adénovirus et le virus Sendai (SeV) mais aussi de plasmides épisomiques.

◆ *Vecteurs dérivés des adénovirus*

Les vecteurs dérivés des adénovirus font partie des premiers vecteurs non intégratifs à avoir été développés pour la reprogrammation cellulaire. L'intérêt majeur est qu'ils occupent naturellement une localisation extra-chromosomique et qu'ils sont modifiés pour bloquer leur réplication.

C'est Stadtfeld et ses collaborateurs, en 2008, qui ont réussi pour la première fois à générer des iPS à partir d'hépatocytes et de fibroblastes murins grâce à l'utilisation de 4 vecteurs dérivés de l'Adénovirus de type 2 (pHIHGA2), chacun codant pour l'un des facteurs de Yamanaka (Stadtfeld *et al.*, 2008b). En revanche, l'efficacité est extrêmement faible, oscillant entre 0,0001% et 0,001% selon le type cellulaire. De plus, une fraction des cellules pluripotentes générées était tétraploïde.

Zhou et Freed ont réussi à obtenir des iPS à partir de fibroblastes humains fœtaux, avec des efficacités toujours extrêmement faibles, aux alentours de 0,002% (Zhou and Freed, 2009).

En plus d'être relativement peu efficaces, il a été montré que les vecteurs dérivés des adénovirus étaient capables de s'intégrer de manière aléatoire au sein du génome, par un mécanisme de recombinaison homologue (Stephen *et al.*, 2008).

Ainsi, ce type de vecteur n'est clairement pas une bonne alternative aux vecteurs intégratifs, étant donné que les efficacités de reprogrammation associées sont très basses et qu'il subsiste des risques élevés d'intégration.

◆ *Vecteurs dérivés du virus Sendai*

Un second type de vecteur d'acide nucléique non intégratif a été généré à partir du Virus Sendai (SeV). Le SeV est un virus à ARN simple brin à réplication cytoplasmique, sans aucune phase sous forme d'ADN.

La protéine F, connue pour induire la fusion cellulaire, a été retirée du génome viral pour générer une première version de vecteurs (SeVV/ Δ F), ayant permis de reprogrammer efficacement des fibroblastes humains et cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon et de sang périphérique. Les efficacités de reprogrammation observées sont très élevées, entre 0,1% et 1% (Fusaki *et al.*, 2009 ; Ye *et al.*, 2013).

De par sa réplication constitutive, le virus est difficile à éliminer des cellules, bien qu'il tende à disparaître naturellement au fil des divisions cellulaires par un phénomène de dilution. Après 10 passages des cellules, le vecteur est indétectable au sein des cellules (Macarthur *et al.*, 2012). Afin d'accélérer le processus d'élimination du virus, une nouvelle génération du vecteur a été développée, possédant une polymérase thermosensible (ts-SEV). Un bref changement de température permet de générer des mutations au sein de cette polymérase, inhibant ainsi la réplication du virus (Ban *et al.*, 2011). Nishimura et ses collaborateurs ont quant à eux généré un vecteur incapable de se répliquer (SeVdp), aussi efficace que le vecteur original, mais l'absence de réplication est contrebalancée par une expression permanente des transgènes (Nishimura *et al.*, 2011).

Les premières versions de ce type de vecteur dérivé du virus SeV étaient confrontées à des problèmes d'interférences entre les virus exprimant les différents facteurs de transcription. De plus l'utilisation de plusieurs virus augmente considérablement le risque d'immunogénicité ainsi que de persistance au sein des cellules. La mise au point d'une nouvelle version du vecteur, au sein duquel il est possible de cloner les séquences de plusieurs facteurs de transcription, a permis d'améliorer considérablement l'efficacité de reprogrammation. Grâce à l'utilisation de cette dernière version de vecteur, il est possible de générer efficacement des iPS à partir de cellules normalement difficiles à

reprogrammer, comme les cellules T de sang périphérique, avec un rendement d'environ 0,1% (Seki *et al.*, 2010).

Les vecteurs de reprogrammation dérivée du SeV sont parmi les plus efficaces à ce jour, avec des rendements de génération d'iPS 20 fois supérieurs à ceux des vecteurs lentiviraux. Le SeV est donc très intéressant puisqu'il est non intégratif et tend à disparaître naturellement des iPS générées au cours des divisions cellulaires tout en étant capable de reprogrammer de nombreux types cellulaires différents.

En revanche, bien que le virus ne soit pas pathogène, il est capable d'infecter l'épithélium pulmonaire, ce qui soulève d'importants problèmes de sécurité (Yonemitsu *et al.*, 2000). Il faut prendre beaucoup de précaution lors de sa manipulation, en particulier lorsqu'il porte les séquences d'oncogènes comme c-Myc ou Klf4. De plus, il a été montré que l'efficacité de la réplicase du virus était variable en fonction de la séquence du transgène (Bayart and Cohen-Haguenauer, 2013). Le risque majeur associé à ce virus à ARN est la conversion d'éléments génomiques en ADNc par une reverse-transcriptase et leur intégration au sein du génome. En effet il a été montré que le génome humain contenait plus de 20 000 pseudogènes, dont certains ont été générés par reverse-transcription de fragments d'ARNm (Torrents *et al.*, 2003). Bien que l'intégration de fragments du virus SeV n'ait jamais été mise en évidence à ce jour, il est important d'avoir conscience de l'existence de tels phénomènes.

◆ Vecteurs épisomiques

Certaines équipes ont développé une alternative non virale à la reprogrammation non intégrative par transfert d'ADN en utilisant des plasmides épisomiques. Cette stratégie, à première vue, semble être une avancée considérable en termes de sécurité puisque qu'elle ne nécessite pas de matériel biologique d'origine virale et que le plasmide n'est en théorie pas intégratif.

Les premières expériences de reprogrammation réalisées avec ce type de vecteur en ont néanmoins vite exposé les limites, à savoir une efficacité de reprogrammation très faible. Ceci peut en grande partie s'expliquer par l'absence de réplication du plasmide au sein des cellules de mammifères, par une efficacité de transfection relativement modérée des plasmides et associée à de la toxicité, mais aussi par une méthylation inhibitrice des

séquences procaryotes du plasmide, pouvant potentiellement conduire à une baisse d'expression (González *et al.*, 2011).

Ainsi, les auteurs ne sont parvenus à reprogrammer que 0,02% des cellules (MEF), y compris en utilisant un vecteur polycistronique codant OSKM, placés sous la dépendance d'un promoteur fort CAG, et en réalisant jusqu'à 4 cycles de transfection (Gonzalez *et al.*, 2009 ; Okita *et al.*, 2008).

Afin d'optimiser le processus de reprogrammation épisomique, des auteurs ont inséré la séquence codant pour EBNA1 (Epstein-Barr Nuclear Antigen 1) ainsi que l'origine de réplication OriP sur le vecteur. EBNA1 est une protéine du virus EBV impliquée sa réplication et sa persistance au sein des cellules. Ainsi, grâce à cette stratégie, le vecteur est capable de se répliquer et donc de se maintenir dans les cellules sous forme de réplicon extra-chromosomique. Malgré de belles promesses, cette nouvelle version des vecteurs épisomiques n'a pas permis d'obtenir une amélioration aussi conséquente qu'attendue, puisque le rendement de reprogrammation de fibroblastes humains en iPS par ces épisomes OriP/EBNA1 est inférieur à 0,001% (Yu *et al.*, 2009).

La taille conséquente de ces vecteurs (5-10 kpb en moyenne) combinée à la perte du plasmide en l'absence de pression de sélection ainsi qu'à la présence de séquences procaryotes, semblent être des obstacles majeurs rencontrés avec ce vecteur. De plus, l'utilisation d'EBNA1 fait considérablement chuter l'intérêt du vecteur en terme de sécurité, cette protéine étant impliquée dans la transformation tumorale associée au virus EBV (Humme *et al.*, 2003).

Afin de répondre à ce problème de taille, des versions miniaturisées des plasmides épisomiques ont été mises au point. On parle de "minicircles", plasmides super-enroulés présentant une taille considérablement réduite, d'au moins 3 kpb, par rapport aux plasmides conventionnels. Cette réduction de taille est associée à la suppression d'éléments procaryotes tels que la cassette de résistance antibiotique ou l'origine de réplication bactérienne (González *et al.*, 2011 ; Hu, 2014). Les "minicircles" présentent des efficacités de transfections supérieures ainsi qu'une persistance de l'expression des transgènes (Chen *et al.*, 2003, 2005) mais restent néanmoins très peu efficaces pour reprogrammer des cellules humaines, avec des rendements d'environ 0,005% (Jia *et al.*, 2010).

En résumé, bien que prometteuse à ses débuts, la reprogrammation à l'aide de vecteurs épisomiques n'a été que très peu utilisée à ce jour, à la fois parce qu'elle est très peu efficace mais aussi puisqu'elle présente certains risques. D'une part, il est difficile d'exclure l'intégration de petits fragments plasmidiques au sein du génome hôte. D'autre part, de manière étonnante, il a récemment été montré que ce vecteur était celui qui générait le plus de cellules aneuploïdes parmi tous les vecteurs non intégratifs (Schlaeger *et al.*, 2014).

c. Reprogrammation par transfert d'ARN

Il existe un troisième mode de génération d'iPS par transfert d'acides nucléiques, basé sur la vectorisation d'ARN. Les ARN utilisés sont soit des ARNm codant les facteurs de reprogrammation soit des miARN intervenant naturellement dans les voies de signalisation en aval des facteurs de pluripotence.

◆ *Reprogrammation par des ARNm*

Afin d'éliminer tout transfert d'ADN, et ainsi limiter le risque d'insertion au sein du génome, Yakubov et ses collaborateurs ont réussi, en 2010, à générer des iPS en introduisant au sein de cellules somatiques les ARNm codant pour les facteurs de Thomson (Yakubov *et al.*, 2010). Les auteurs ont utilisé quatre ARNm codant les 4 facteurs OSNL, modifiés dans leurs régions non traduites (UTR) 5' et 3'. En 5' UTR, une séquence IRES permettant l'initiation de la traduction par le ribosome a été ajoutée ; en 3' UTR, ces ARNm possèdent une séquence de polyadénylation. L'efficacité de transfection est très forte puisque 70% des cellules expriment les protéines encodées dès 24h après transfection, ce qui est un des atouts majeurs de cette méthode de reprogrammation. A partir de fibroblastes humains de nouveau-né, l'efficacité de reprogrammation atteint 0,05%, ce qui est comparable à l'efficacité des vecteurs lentiviraux.

La même année, Warren et ses collaborateurs ont amélioré cette méthode reprogrammation en insérant une séquence d'initiation de la traduction plus forte dans la région 5' UTR et la séquence signal de polyadénylation du gène de la β -globine connue pour améliorer le processus de terminaison de la traduction ; dans la région 3' UTR, (Warren *et al.*, 2010). Un des freins à la reprogrammation par les ARNm est la forte réaction immunitaire innée engendrée, via les récepteurs TLR7 et TLR8, conduisant à l'activation de NF κ B. C'est pourquoi les auteurs ont également modifié la "cap" des ARN en remplaçant la

methylocytosine en cytosine ainsi que l'uridine en pseudo-uridine. Grâce à ces modifications, les auteurs ont réussi à atteindre plus de 2% d'efficacité de reprogrammation sur le même type cellulaire, à l'aide d'une combinaison des facteurs de Yamanaka associés à Lin28a. Ces résultats font de la reprogrammation par ARNm la méthode la plus efficace à ce jour, du moins sur les fibroblastes normaux.

En revanche, la transfection d'ARN étant transitoire et l'ARN étant une molécule extrêmement fragile, les auteurs ont dû employer jusqu'à 17 cycles de transfection. Ainsi, l'utilisation d'une telle stratégie peut s'avérer problématique pour des cellules réfractaires à la transfection comme les cellules sanguines, et est associée à une forte toxicité. Une étude récente a d'ailleurs confirmé qu'à l'heure actuelle, la reprogrammation par ARNm ne fonctionnait pas sur les cellules sanguines, limitant ainsi fortement le potentiel de cette méthode (Schlaeger *et al.*, 2014).

Ainsi, bien que très efficaces pour reprogrammer des fibroblastes, les méthodes basées sur le transfert d'ARNm nécessitent de nombreux cycles de transfection, ce qui est susceptible d'endommager les cellules en plus d'être relativement fastidieux. A ce jour, seuls des fibroblastes ont pu être reprogrammés par cette stratégie, ce qui restreint fortement ses champs d'application. Enfin, le transfert d'ARNm soulève la même interrogation que le virus SeV, à savoir la possibilité de rétrotransposition de fragments d'ARN au sein du génome hôte.

◆ *Reprogrammation par des micro-ARN*

Des travaux récents ont mis en évidence la possibilité de reprogrammer des cellules somatiques en iPS en utilisant des micro-ARN (miARN). Les miARN sont des petits fragments d'ARN simple brin non codant, assurant un rôle régulateur, en favorisant ou réprimant la traduction de certains ARNm. Il est possible d'apporter ces miARN sous forme synthétique (Judson *et al.*, 2009) ou de les faire exprimer grâce à un vecteur lentiviral (Li *et al.*, 2011), la première méthode limitant fortement les risques d'insertion génomique. Les mi-RNA possèdent plusieurs avantages : (i) ils ne présentent a priori aucun risque d'intégration ; (ii) de par leur petite taille (une vingtaine de nucléotides en moyenne), ils peuvent être facilement synthétisés ; (iii) ils sont plus stables que les ARNm (Hu, 2014).

Certains miARN jouent un rôle important dans le réseau de régulation des cellules ES. En particulier le groupe (cluster) miR-302, directement régulé par Oct4 et Sox2, est impliqué dans la régulation négative de l'expression de gènes développementaux et d'oncogènes (Card *et al.*, 2008 ; Lin *et al.*, 2008). Il semble également impliqué dans le blocage de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) initiée par le TGF- β .

Des équipes ont montré qu'il était possible de reprogrammer des cellules de follicules pileux (Lin *et al.*, 2011) grâce à la transfection du cluster miR-302 synthétique, mais aussi des fibroblastes humains avec différentes combinaisons de clusters, comme miR-302/367 (Subramanyam *et al.*, 2011) ou miR-200/302/369 (Miyoshi *et al.*, 2011). Cependant, les efficacités associées sont faibles, aux alentours de 0,001% pour des fibroblastes humains.

De plus, la reprogrammation par des miARN synthétiques nécessite des transfections répétées des cellules, soulevant ainsi les mêmes problèmes que pour les ARNm. De plus, l'efficacité de cette méthode demeure à ce jour relativement faible en comparaison des ARNm par exemple, et son utilisation semble également restreinte à certains types cellulaires, en particulier les fibroblastes.

ii. Reprogrammation par transfert de protéines

Afin de limiter tout risque d'altération génétique des cellules, la manière la plus rationnelle pour générer des iPS de manière sécurisée est d'apporter les facteurs de transcription embryonnaires directement sous leur forme protéique.

C'est Zhou et ses collaborateurs qui ont été les premiers à réaliser cette prouesse sur des MEF en 2009 (Zhou *et al.*, 2009). Pour faire pénétrer les facteurs de transcription au sein des cellules, les auteurs ont utilisé un CPP (Cell-Penetrating Peptide). Les CPP sont des séquences peptidiques, naturelles ou artificielles, capables de traverser la membrane plasmique des cellules. Depuis cette preuve de concept, la génération d'iPS par transfert de protéines a été réalisée par plusieurs équipes. Les vecteurs les plus utilisés pour cela sont des CPP, mais il est également possible d'utiliser d'autres moyens pour faire pénétrer ces facteurs de transcription au sein des cellules, par exemple des lipides, des nanotubes ou une porine bactérienne.

a. Utilisation des CPP comme vecteurs de facteurs de reprogrammation

◆ Généralités sur les CPP

Les CPP ont été identifiés grâce à l'observation de certaines protéines virales capables de traverser la membrane plasmique des cellules. Les premières protéines identifiées possédant de telles propriétés sont la "Trans-Activating Protein" (TAT) du virus HIV (Frankel and Pabo, 1988 ; Green and Loewenstein, 1988) ainsi que l'homéodomaine Antennapedia de *Drosophila melanogaster* (Joliot *et al.*, 1991). Des études ont permis d'identifier les domaines des protéines impliqués dans l'internalisation à savoir le peptide Tat (Green *et al.*, 1989 ; Vivès *et al.*, 1997), correspondant à la région basique de la protéine TAT du virus HIV et la Pénétratine, correspondant à la troisième hélice de l'homéodomaine Antennapedia (Derossi *et al.*, 1994). Depuis, les propriétés de pénétration cellulaire de plusieurs peptides ont pu être mises en évidence. Certains sont dérivés de protéines comme Tat ou la Pénétratine, on parle de "Peptide Transduction Domain" ; d'autres sont synthétiques et ont été mis au point grâce à des études de modélisation. Ils peuvent être également regroupés selon leurs propriétés physico-chimiques (cationiques, hydrophobes, amphipatiques (présence d'un domaine polaire et d'un domaine hydrophobe)) (Tableau 6).

Tableau 6. Principales caractéristiques de quelques CPP parmi les plus étudiés.

CPP	Origine	Nature	Séquence	Référence
MAP	Synthétique	Amphipathique	KLALKLALKALKALKAL A	(Oehlke <i>et al.</i> , 1998)
Pénétratine	Homéodomaine Antennapedia (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Amphipathique	GWTLNSAGYLLGKINLK ALAALAKISIL	Derossi <i>et al.</i> , 1994
Poly-Arginines	Synthétique	Cationique	Rx (7-11)	Rothbard <i>et al.</i> , 2000
pVEC	Vascular Endothelial Cadherin	Amphipathique	LLIILRRRIRKQAHAAHSK	Elmqvist <i>et al.</i> , 2001
Tat	Protéine TAT (HIV)	Cationique	GRKKRRQRRR	Vivès <i>et al.</i> , 1997
Transportan	Synthétique	Amphipathique	GWTLNSAGYLLGKINLK ALAALAKISIL	Pooga <i>et al.</i> , 1998
VP22	Virus Herpès Simplex	Amphipathique	VDASTATRGRSAASRPT ERPRAPARSASRPRRPVE	Elliott and O'Hare, 1997

En ce qui concerne l'internalisation des CPP, la première étape consiste en l'interaction avec les héparanes sulfates chargés négativement à la surface des cellules (Wallbrecher *et al.*, 2014). Ensuite, la plupart des CPP pénètrent dans les cellules principalement par des mécanismes d'endocytose (Kaplan *et al.*, 2005 ; Nakase *et al.*, 2004 ; Richard *et al.*, 2003, 2005) mais ils sont aussi capables de passer à travers la bicouche lipidique grâce à un mécanisme de translocation directe. Le mode de pénétration employé par le CPP semble à la fois lié à sa concentration mais aussi à la nature de la protéine cargo (protéine d'intérêt attachée) (Madani *et al.*, 2011). La translocation directe permet d'éviter le piégeage des protéines dans des vésicules d'endocytose et la formation d'endo-lysosomes conduisant à la dégradation des protéines internalisées.

Les propriétés de pénétration cellulaire des CPP ont été mises à profit pour le transport intracellulaire de molécules d'intérêt, incapables de pénétrer par elles-mêmes. Il est possible, par un couplage covalent ou non covalent, d'associer aux CPP des molécules de différentes natures telles que des protéines, des petites molécules, des oligonucléotides, des plasmides ou encore des agents de contraste pour l'imagerie (Heitz *et al.*, 2009).

Bien que certains CPP soient dérivés de virus, ils ne contiennent aucune information génétique et ne présentent aucun pouvoir infectieux. Ils constituent ainsi un outil très intéressant en thérapie humaine, pour la vectorisation de biomolécules actives.

◆ *Reprogrammation cellulaire grâce à des CPP*

Comme indiqué précédemment, Zhou et ses collaborateurs, en 2009, ont généré des iPS à partir de fibroblastes murins en utilisant des CPP pour vectoriser les facteurs de transcription OSKM. Pour cela, les auteurs ont réalisé la production en système *E. coli* des facteurs fusionnés à un domaine poly-arginines R11 en position C-terminale. Les auteurs ont ainsi démontré qu'il est possible de générer des cellules souches pluripotentes sans apport de matériel génétique exogène. Bien que d'autres modes de vectorisation aient été employés, les CPP sont aujourd'hui les vecteurs de référence pour la génération d'iPS par transfert de protéines (Tableau 7).

Tableau 7. Aperçu des différents protocoles de génération d'iPS par transfert de protéines.

Référence	Cellules	Vecteur	Facteurs	Production	Conditions de reprogrammation	Efficacité
Zhou <i>et al.</i>, 2009a	MEF	11R (CPP)	OSKM	<i>E.coli</i>	4 traitements de 12h à 8µg/ml, espacés de 48h VPA* 1 mM	0,006%
Kim <i>et al.</i>, 2009a	Fibroblastes dermiques humains de nouveau-né (HNDF)	9R (CPP)	OSKM	HEK	Lysat de HEK, 8h par semaine, sur 6 semaines	0,001%
Cho <i>et al.</i>, 2010	Fibroblastes murins (MEF et peau)	Streptolysine O	Facteurs embryonnaires	Cellules ES	Lysat de cellules ES pendant 24h	0,0007%
Zhang <i>et al.</i>, 2012	HNDF	HIV-TAT (CPP)	OSKMN	<i>E. coli</i>	16 traitements de 2h à 50 nM, espacés de 24h VPA* 125 µM	0,01%
Lee <i>et al.</i>, 2012	HNDF (BJ)	11R (CPP)	OSKM	Société Stemgent	7 jours à 200 mM, 13 jours à 100 mM	0,015%
Khan <i>et al.</i>, 2013	HNDF	Lipide bolamphiphile	SKN + Nr5a2	<i>E. coli</i>	3 traitements de 3h espacés de 24h, Ratio protéines : lipides 7 : 1 VPA* 1 mM	0,05%
Cho <i>et al.</i>, 2013	Cellules souches neuronales murines	Nanotubes	OSKMN	<i>E. coli</i>	3 semaines de traitement	?
Nemes <i>et al.</i>, 2014	MEF	HIV-Tat (CPP)	OSKM	<i>E.coli</i>	4 traitements de 12h à 8µg/ml, espacés de 48h	0,01%
Park <i>et al.</i>, 2014	Hépatocytes murins	9R (CPP)	OSKM	HEK	6 traitements de 16h avec 2 µg de chaque protéine, espacés de 48h	0,01%

9R : 9xarginines ; 11R : 11xarginines ; HNDF : Human Neonatal Dermal Fibroblasts ; HEK : Human Embryonic Kidney; VPA* : acide valproïque (voir partie II.4 sur l'optimisation des conditions de reprogrammation)

La même année, il a été montré qu'il était possible de générer des iPS humaines par transfert de protéines (Kim *et al.*, 2009a). Les auteurs ont utilisé un lysat de cellules HEK dans lesquelles la production des facteurs couplés à un domaine poly-arginines 9R en position C-terminale a été réalisée, qu'ils ont appliqués directement sur des fibroblastes. En 2012, c'est le peptide Tat du HIV, fusionné en position N-terminale aux facteurs OSKM, qui a permis de générer des iPS humaines avec une efficacité atteignant 0,01% (Zhang *et al.*, 2012a).

Les domaines poly-arginines et Tat sont les seuls CPP documentés pour la génération d'iPS à ce jour. Ceci est certainement lié à leur très faible taille induisant un encombrement stérique limité au niveau des extrémités des facteurs de transcription, car le maintien de la structure est essentiel à l'activité. Il est intéressant de noter que les facteurs de transcription associés aux CPP sont principalement produits en système *E. coli*, ce qui souligne que les facteurs de transcription peuvent induire la mise en place du réseau de pluripotence, y compris en l'absence de modifications post traductionnelles.

b. Autres méthodes de vectorisation de protéines pour la reprogrammation

Bien que les CPP soient majoritairement utilisés, d'autres méthodes de génération d'iPS par transfert de protéines ont vu le jour. On compte notamment :

- L'utilisation d'un lysat de cellules ES transféré dans le cytoplasme des cellules somatiques grâce à la Streptolysine O, induisant la formation de pores dans la membrane plasmique (Cho *et al.*, 2010). Cette méthode, très peu efficace, ne constitue pas une avancée majeure étant donné que la streptolysine est à l'origine d'une cytotoxicité importante et nécessite une source de cellules ES.
- L'utilisation d'un lipide bolamphiphile cationique (chaîne hydrophobe avec deux extrémités chargées positivement). Un complexe non covalent formé entre les lipides cationiques et les facteurs de transcription est capable de pénétrer efficacement au sein des cellules. Les auteurs ont utilisé une combinaison de facteurs inédite SKM + NR5A2 (NR5A2 participe au maintien de l'expression d'Oct4 dans les cellules pluripotentes, Masui *et al.*, 2007). Cette méthode relativement efficace paraît très prometteuse et laisse envisager la possibilité d'utiliser d'autres complexes lipidiques, comme les liposomes, pour transporter les facteurs de transcription.
- Le transport des facteurs de reprogrammation via un nanotube, méthode extrêmement innovante à l'interface entre le monde de la biologie et celui des nanomatériaux (Cho *et al.*, 2013).

Pour résumer, la génération d'iPS par transfert de protéines semble le moyen le plus pertinent pour obtenir des cellules stables génétiquement. En effet, la reprogrammation par un transfert de protéines génère cinq fois moins de CNV qu'une reprogrammation intégrative (Park *et al.*, 2014). Ces méthodes présentent l'avantage de ne transférer aucun

matériel génétique et de permettre un contrôle temporel précis de la reprogrammation. En revanche elles sont relativement peu efficaces, en termes de rendement et de délai. Ceci est certainement lié à une dégradation rapide des protéines exogènes une fois dans les cellules. De plus elles requièrent des étapes de production et purification parfois fastidieuses.

iii. Synthèse sur les systèmes de reprogrammation

Les caractéristiques des principaux systèmes de reprogrammation abordés sont présentées dans le Tableau 8.

Tableau 8. Caractéristiques de principaux systèmes de reprogrammation cellulaire. Les comparaisons sont réalisées sur des expériences de génération d'iPS à partir de fibroblastes humains avec les facteurs OSKM, et sans ajout de molécules favorisant le processus de reprogrammation.

Vecteur	Efficacité	Apparition des colonies	Références	Inconvénients
Intégratifs (rétro/lentiviraux, transposons)	0,01-0,5%	J12-28	Awe <i>et al.</i> , 2013 ; Rodríguez-Pizà <i>et al.</i> , 2009 ; Schlaeger <i>et al.</i> , 2014 ; Takahashi <i>et al.</i> , 2007	Intégration génomique Taux important de CNV
Adénoviraux	0,0001-0,001%	J25-30	Zhou and Freed, 2009	Intégration génomique possible Très peu efficaces
SeV	0,1%	J27	Fusaki <i>et al.</i> , 2009 ; Schlaeger <i>et al.</i> , 2014	Infecte l'épithélium pulmonaire Risque potentiel de rétrotransposition
Episomes	0,016%	J14-28	Rasmussen <i>et al.</i> , 2014	Transfections difficiles Pourcentage élevé de cellules aneuploïdes
ARNm	0,05-2%	J15-J20	Warren <i>et al.</i> , 2010 ; Yakubov <i>et al.</i> , 2010	Plusieurs transfections nécessaires Fibroblastes uniquement Risque potentiel de rétrotransposition
CPP	0,0001-0,015%	J30-56	Kim <i>et al.</i> , 2009a ; Lee <i>et al.</i> , 2012	Production et purification des facteurs de transcription Efficacité modérée

Les méthodes de reprogrammation cellulaire requièrent pour la plupart l'utilisation de vecteurs intégratifs ou le transfert d'acides nucléiques, susceptibles d'induire des instabilités au niveau génomique. Bien que globalement moins efficace, la

reprogrammation par transfert de protéines, notamment par des CPP, est à ce jour la méthode la plus prometteuse pour obtenir des cellules pluripotentes de grade clinique. Le développement de nouveaux vecteurs améliorant les rendements apparaît comme un défi majeur de ces prochaines années.

2. Choix de la source de cellules

Le choix du type cellulaire à reprogrammer est un critère extrêmement important, à la fois en terme d'efficacité de reprogrammation mais aussi pour les applications finales des iPS.

Le fibroblaste est le type cellulaire majoritairement utilisé pour générer des iPS. Ce n'est pas pour autant la cellule la plus facile à reprogrammer ni la plus facilement accessible. En effet, à titre comparatif, des kératinocytes se reprogramment 100 fois plus facilement que des fibroblastes dans des conditions équivalentes (Aasen *et al.*, 2008). En revanche, les mécanismes et les événements moléculaires associés à la reprogrammation du fibroblaste sont les plus documentés à ce jour.

La maturité cellulaire est également un élément clé dans le processus de reprogrammation. A titre d'exemple, l'efficacité de reprogrammation d'une cellule souche hématopoïétique ou d'un progéniteur lymphoïde est supérieure à celle de lymphocytes B et T d'un facteur 300 (Eminli *et al.*, 2009). Ces différences d'efficacité sont en grande partie associées à des niveaux d'expression variables de facteurs endogènes au sein des différents types cellulaires, ou encore à des profils épigénétiques plus "permissifs" à l'activité des facteurs exogènes.

La reprogrammation est enfin étroitement liée aux capacités prolifératives des cellules. En particulier, l'expression de p53 constitue une véritable barrière au processus de reprogrammation (Menendez *et al.*, 2010). D'une part, p53 activé par les facteurs OSK, bloque la transition MET initiale. D'autre part, l'expression de ce suppresseur de tumeur induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Des cellules proliférantes sont ainsi reprogrammées beaucoup plus efficacement que des cellules sénescents, caractérisées par un fort niveau d'expression de p53. De la même manière, alors qu'il faut seulement 12 jours pour obtenir des iPS à partir de fibroblastes de nouveau-né, il en faut presque 40 pour

reprogrammer des cellules d'individus centenaires (Lapasset *et al.*, 2011 ; Yu *et al.*, 2007b).

D'une manière générale, une cellule jeune et/ou peu différenciée est beaucoup plus facile à reprogrammer qu'une cellule mature spécialisée, qui plus est âgée (Figure 10).

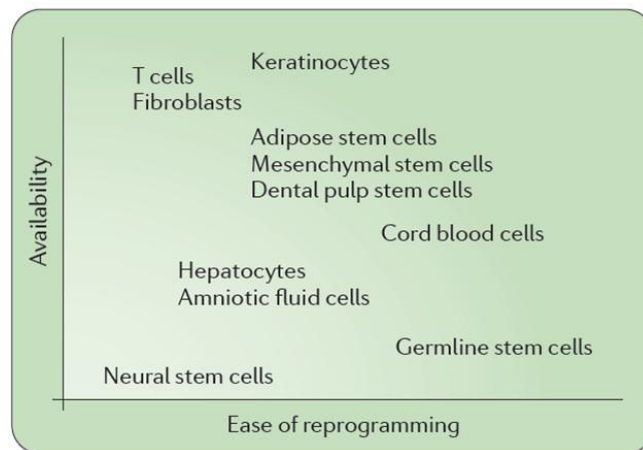


Figure 10. Facilité de reprogrammation et accessibilité des principaux types cellulaires utilisés en reprogrammation (González *et al.*, 2011).

3. Différentes combinaisons de facteurs de transcription

Les cellules somatiques peuvent être reprogrammées en iPS en employant différentes combinaisons de facteurs de transcription. Le choix de la combinaison est très fortement lié au type cellulaire à reprogrammer, mais aussi au système de reprogrammation utilisé.

La combinaison la plus utilisée encore à ce jour est celle de Yamanaka, OSKM. En 2006, lorsque Yamanaka découvre cette combinaison, les protocoles de reprogrammation sont basés pour la plupart sur l'utilisation de vecteurs intégratifs, associés au risque de réexpression des transgènes. Ainsi, de par le caractère proto-oncogène de Klf4 et surtout Myc, d'autres combinaisons ont vu le jour, en remplaçant certains facteurs par d'autres ou encore en diminuant le nombre de facteurs.

L'autre combinaison bien connue est celle mise au point par l'équipe de James Thomson en 2007, comprenant les facteurs Oct4, Sox2, Nanog et Lin28a, permettant de s'affranchir de

Myc (Yu *et al.*, 2007b). Bien que cette combinaison fonctionne, elle semble en revanche moins efficace que le cocktail de Yamanaka et n'a finalement que peu été utilisée en comparaison de ce dernier. Les facteurs de Yamanaka sont certainement les plus efficaces à ce jour, puisque, comme nous l'avons abordé précédemment, Myc et Klf4 semblent jouer un rôle très précoce dans l'initiation de la reprogrammation, contrairement à Lin28a et Nanog qui interviennent plus tard (Soufi *et al.*, 2012). De plus, bien que Myc ne soit pas présent, cette combinaison n'est finalement pas si sécurisée dans le cadre d'une reprogrammation intégrative, puisque Lin28a est notamment impliqué dans la levée de la répression de l'expression de c-Myc.

Selon le type cellulaire choisi, il est possible de réduire considérablement le nombre de facteurs de transcription utilisés. Comme indiqué dans la partie précédente, certains types cellulaires peuvent se reprogrammer plus facilement puisqu'ils expriment déjà un niveau élevé de certains facteurs de transcription (Pour une revue sur les différentes combinaisons déjà employées à ce jour, voir Bayart and Cohen-Haguenauer, 2013). C'est notamment le cas des cellules souches neuronales, issues de l'ectoderme, présentant une expression très forte de Sox2, et pour lesquelles le seul apport d'Oct4 à l'aide d'un vecteur rétroviral permet la conversion en iPS (Kim *et al.*, 2009b).

Alors qu'il est possible de diminuer le nombre de facteurs pour reprogrammer certains types cellulaires, d'autres cellules sont réfractaires à la reprogrammation par les quatre facteurs de Yamanaka. C'est notamment le cas des fibroblastes sénescents, retrouvés chez les individus âgés, pour lesquels l'expression de la combinaison des facteurs de Yamanaka avec celle de Thomson, soit OSKMNL, à l'aide de vecteurs lentiviraux, a permis de générer des iPS (Lapasset *et al.*, 2011).

Bien qu'OSKM soit la combinaison de référence, de nombreuses associations de facteurs de transcription ont été utilisées à ce jour pour générer des iPS. Le choix des facteurs de transcription dépend à la fois de la source de cellules mais aussi du système de reprogrammation utilisé. Il devient ainsi possible d'ajuster à façon la combinaison de facteurs de transcription nécessaires, en fonction des outils moléculaires et des matériaux biologiques disponibles.

4. Optimisation du processus de reprogrammation

i. Molécules favorisant la reprogrammation

a. Modulation épigénétique

Pour simplifier, la reprogrammation cellulaire en iPS consiste à "remettre à zéro" les marques épigénétiques des cellules somatiques, afin d'obtenir une signature transcriptionnelle proche de celle des cellules ES. Les facteurs de transcription embryonnaires exogènes sont confrontés à des marques épigénétiques répressives au niveau de leur gènes cibles (Gifford and Meissner, 2012). Ainsi, l'efficacité de reprogrammation est relativement faible, et ce même en utilisant les systèmes les plus performants.

C'est pourquoi plusieurs équipes ont cherché à optimiser leurs rendements de reprogrammation en utilisant des additifs ayant un impact direct sur la modification du paysage épigénétique des cellules. Parmi ces additifs on retrouve principalement de petites molécules chimiques et à moindre mesure des shRNA (small hairpin RNA), agissant au niveau des principales enzymes du remodelage épigénétique, telles que les HDAC, les HMT. Il a été montré que l'emploi de ces molécules améliorerait considérablement l'efficacité de génération d'iPS, à la fois dans l'initiation du processus mais aussi en favorisant la progression de la mise en place du réseau de pluripotence au sein de cellules partiellement reprogrammées (Tableau 9).

Les molécules les plus efficaces sont les inhibiteurs non spécifiques des HDAC, en particulier l'acide valproïque (VPA) et le butyrate de sodium, permettant d'induire une décompaction globale de la chromatine en inhibant les enzymes responsables de l'acétylation des histones. Le VPA est la molécule la plus couramment utilisée comme additif modulateur des histone déacétylases. L'utilisation d'une forte concentration de VPA (1 mM) permet par exemple de convertir des fibroblastes humains en iPS avec seulement deux facteurs de transcription exprimés et une efficacité avoisinant 0,05% (Huangfu *et al.*, 2008a).

La vitamine C est quant à elle présente dans la formulation de nombreux milieux dédiés à la reprogrammation et la culture des cellules souches pluripotentes. Son action au niveau

de l'ADN et des histones consiste notamment dans l'activation de l'expression des gènes épithéliaux, favorisant la transition MET et donc la phase d'initiation de la reprogrammation (Wang *et al.*, 2011b). Il est également possible d'agir plus spécifiquement sur certaines enzymes comme DOT1L, dont l'inhibition favorise l'expression de Nanog et Lin28a.

Tableau 9. Liste des principales molécules de modulation épigénétique utilisées pour la reprogrammation.

Molécule	Rôle	Efficacité	Conditions de reprogrammation	Références
5-aza-cytidine	Inhibition DNMT	x4	MEF, vecteur lentiviral inducible, O+S+K+M	Mikkelsen <i>et al.</i> , 2008
Acide valproïque (VPA)	Inhibition HDAC	x20	HNDF, vecteur rétroviral, O+S	Huangfu <i>et al.</i> , 2008a
		x40	MEF, vecteur rétroviral, O+S+K	Huangfu <i>et al.</i> , 2008b
Bix-01294	Inhibition HMT G9a	x3	MEF, vecteur rétroviral, O+K	Shi <i>et al.</i> , 2008
Butyrate de sodium	Inhibition HDAC	x51	HNDF, vecteur rétroviral, O+S+K+M	Mali <i>et al.</i> , 2010
EPZ00477	Inhibition HMT DOT1L	x4	Fibroblastes murins, vecteur rétroviral, O+S+K+M	Onder <i>et al.</i> , 2012
shRNA anti-DOT1L	Inhibition DOT1L	x3	Fibroblastes murins, vecteur rétroviral, O+S+K+M	Onder <i>et al.</i> , 2012
Vitamine C	Activation histone-déméthylases Jhdm1a/1b & ADN déméthylases Tet1/2	x3	HNDF, vecteur rétroviral, O+S+K+M	Esteban <i>et al.</i> , 2010

Grâce à l'émergence de ces modulateurs épigénétiques, il est ainsi possible d'agir spécifiquement sur le paysage épigénétique des cellules afin de faciliter la mise en place du réseau de pluripotence et ainsi d'améliorer le processus de reprogrammation.

b. Modulation des voies de signalisation cellulaire

De nombreuses protéines du cycle cellulaire sont impliquées dans la reprogrammation. En modulant leur expression, il devient possible de favoriser la génération d'iPS. De manière non exhaustive, nous pouvons par exemple citer l'implication de p53, de la voie du TGF- β ou encore de la kinase GS3K.

Nous avons vu précédemment que p53 était un frein à la transition MET lors de la phase initiale mais aussi au processus de reprogrammation en général. Ainsi, en inhibant

l'expression de p53 grâce à un shRNA, Rasmussen et ses collaborateurs ont augmenté l'efficacité de reprogrammation de fibroblastes humains par un vecteur épisomique d'un facteur 8 (Rasmussen *et al.*, 2014).

De la même manière, la voie du TGF- β favorise l'expression des gènes du mésenchyme, défavorables à l'initiation de la reprogrammation. Ainsi, le blocage de la voie du TGF- β par des inhibiteurs chimiques, tels que des inhibiteurs de la kinase Alk5, permet d'augmenter l'efficacité de reprogrammation de MEF jusqu'à 60 fois (Ichida *et al.*, 2009 ; Maherali and Hochedlinger, 2009).

Enfin, en 2010 Somers et ses collaborateurs ont montré que l'inhibition de la GS3K pouvait remplacer Myc. Pour cela, les auteurs ont utilisé un vecteur intégratif de type STEMCCA codant OSK pour reprogrammer des fibroblastes humains. Alors qu'aucune colonie n'a pu être obtenue avec l'expression des trois facteurs seuls, l'ajout de l'inhibiteur chimique de la kinase a permis de reprogrammer les cellules avec une efficacité de 0,01% (Somers *et al.*, 2010).

c. Génération d'iPS sans facteurs de transcription exogènes

Récemment, une équipe a tiré profit des différentes études sur l'impact des molécules chimiques sur la reprogrammation en réussissant à générer des iPS à partir de fibroblastes embryonnaires murins sans aucun apport de facteur de transcription exogène (Hou *et al.*, 2013).

Pour cela, les auteurs ont réalisé le criblage d'une banque de molécules avant d'identifier une combinaison de plusieurs de ces molécules permettant de générer des iPS avec une efficacité relativement élevée, de l'ordre 0,2%. Le cocktail comprend : des modulateurs épigénétiques (VPA, Tranylcypromine, DZNep), un inhibiteur de GS3K (CHIR99021), un activateur de l'adénylate cyclase (Forskoline), un inhibiteur de la voie du TGF- β (616452).

Ces données mettent bien en avant l'influence des voies de signalisation cellulaire, en plus de l'épigénétique, sur le processus de reprogrammation cellulaire.

Cette méthode présente l'avantage d'être relativement peu coûteuse et plus reproductible que les autres systèmes de reprogrammation. De plus les molécules chimiques sont peu immunogènes en comparaison de vecteurs viraux, par exemple. En revanche nous n'avons

à ce jour aucun recul sur l'impact cellulaire de ce type de molécule à long terme, au niveau chromosomique et sub-chromosomique. Par ailleurs, aucune autre équipe n'a été en mesure de reproduire les résultats de cette équipe sur d'autres types cellulaires, notamment humaines.

Ainsi, à l'heure actuelle, il est difficile de se prononcer sur la pertinence d'une reprogrammation exclusivement basée sur l'utilisation de molécules chimiques.

ii. Conditions de culture

Les conditions de culture jouent également un rôle important dans la reprogrammation, en particulier le taux d'oxygène auquel les cellules sont cultivées ainsi que la qualité du sérum utilisé.

Le taux d'oxygène est un paramètre important, les conditions d'hypoxie favorisant considérablement le processus de reprogrammation. Le taux d'oxygène optimal semble être de 5%, contre 21% pour des conditions de normoxie (Yoshida *et al.*, 2009). L'hypoxie est responsable de la stabilisation des protéines HIF, induisant non seulement la mise en place d'un métabolisme glycolytique mais aussi une diminution de l'activité apoptotique des cellules via l'inhibition de la caspase 3 (Mathieu *et al.*, 2014). Pour illustrer ces propos, l'application de conditions hypoxiques en association avec un traitement au butyrate de sodium permet de reprogrammer des cellules souches hématopoïétiques CD34+ et des cellules mononuclées de sang périphérique avec un épisode codant seulement Oct4 et Sox2, et ce de manière très efficace (2% de cellules reprogrammées) (Meng *et al.*, 2012).

Le sérum présent dans le milieu de culture est également un paramètre important. Le SVF (Sérum de Vœu Fœtal) utilisé classiquement pour la culture cellulaire, peut être à l'origine de problèmes de reproductibilité associés à la variabilité existante entre les lots. De plus, il contient des protéines inhibitrices comme le TGF- β . L'utilisation d'un substitutif de synthèse, le KOSR (KnockOut Serum Replacement), favorise le processus de reprogrammation d'un facteur 100 et limite cette variabilité (Zhao *et al.*, 2010).

Nous venons de voir que l'utilisation d'additifs moléculaires intervenant au niveau épigénétique et dans les voies de signalisation cellulaire, mais aussi l'application de conditions de culture cellulaire bien définies telle qu'une hypoxie à 5% d'O₂, favoriseraient considérablement le processus de reprogrammation. Il faut être extrêmement vigilant en

lisant les revues traitant des différences d'efficacités entre les vecteurs, les travaux cités présentant très souvent des conditions très différentes, plus ou moins favorables à la reprogrammation.

Pour résumer, il est aujourd'hui possible de générer des iPS à partir de différents types cellulaires. L'efficacité de reprogrammation dépend à la fois du type cellulaire à reprogrammer, du vecteur employé ainsi que de la combinaison de facteurs de transcription exogènes. Les systèmes de reprogrammation basés sur un transfert d'acides nucléiques sont les plus utilisés et les plus efficaces à ce jour. Cependant ils sont pour la plupart associés à des risques d'insertion mutagène au sein du génome. Les méthodes basées sur un transfert de protéines sont à ce jour les plus prometteuses dans l'optique de garantir la sécurité, mais leur efficacité est limitée. Le processus de reprogrammation peut être favorisé par l'application de conditions de culture particulières ou encore l'utilisation de molécules modulatrices du paysage épigénétique ou des voies de signalisation cellulaire.

III. Caractérisation de la pluripotence

L'évaluation de la pluripotence, c'est-à-dire de la capacité des cellules à conserver un phénotype indifférencié au fil des cycles de division, avec un pouvoir de différenciation en théorie illimité, peut être mise en évidence par différentes méthodes, *in vitro* et *in vivo* (Tableau 10).

Tableau 10. Principaux tests utilisés pour la caractérisation des cellules ES et des iPS humaines.

Test de pluripotence	Techniques employées	Description/cibles	Temps requis
Analyse morphologique	Microscopie optique	Formation de colonies denses avec des bords bien délimités de cellules arrondies avec un rapport nucléocytoplasmique élevé.	< 1h
Analyse de marqueurs phénotypiques	Immunomarquage fluorescent : Analyse par cytométrie en flux ou microscopie en fluorescence	<ul style="list-style-type: none"> - Antigènes de surface caractéristiques des cellules ES : protéines de la matrice extracellulaire (Tra-1-60 et Tra-1-81), glycoprotéines membranaires (SSE-3 et SSEA-4) - Facteurs de transcription embryonnaires : Oct4, Nanog, Sox2, Klf4 - Phosphatase alcaline 	1-2 jours
Analyse du réseau transcriptionnel	PCR quantitative en temps réel (qPCR)	Détection des transcrits codant : <ul style="list-style-type: none"> - Facteurs de transcription embryonnaires : <i>oct4</i>, <i>nanog</i>, <i>sox2</i> - Protéines impliquées dans l'auto-renouvellement : <i>rex1</i>, <i>gdf3</i> - Protéines assurant la prolifération : <i>tert</i>, <i>fgf4</i> 	1-3 jours
Analyse des marques épigénétiques	Séquençage au bisulfite	Méthylation ADN des îlots CpG	3 jours
	CHIP on Chip	Domaines bivalents H3K4me3/H3K27me3	6 jours
Formation de corps embryoïdes	Histologie Immunohistochimie qPCR	Structures tissulaires : coloration à l'hématoxyline et à l'éosine <hr/> <u>Endoderme</u> : α -amylase, AFP (alpha-Fetoprotein), FoxA2 (Hepatocyte nuclear factor 3-beta), PDX1 (Pancreatic and Duodenal Homeobox 1) <hr/> <u>Mésoderme</u> : CD34, FLT1 (Vascular endothelial growth factor receptor 1), RUNX1 (Runt-related transcription factor 1), SMA (Smooth Muscle Actin) <hr/> <u>Ectoderme</u> : GFAP (Glial fibrillary acidic protein), Nestine, Pax6 (Paired-box 6), Sox1	2-3 semaines
Formation de tératomes <i>in vivo</i>	Histologie Immunohistochimie	Identiques à corps embryoïdes	3-10 semaines

i. Caractérisation *in vivo*

a. Formation de tératomes *in vivo*

En 1981, Gail Martin a montré que l'injection sous-cutanée de cellules ES dérivées de blastocystes chez des souris athymiques conduisait à la formation de tératomes (Martin, 1981), tumeurs solides constituées d'un mélange des trois feuillets embryonnaires.

C'est la souris immunodéficiente NOD/SCID (Non-Obese Diabetic / Severe Combined ImmunoDeficient), qui est généralement utilisée pour cet essai. Elle est caractérisée par une déficience immunitaire des systèmes inné et adaptatif avec notamment l'incapacité de produire des lymphocytes B et T matures. Elle est donc tolérante aux xénogreffes. Aujourd'hui, le test de formation de tératomes est le véritable "gold standard" permettant d'évaluer la pluripotence des cellules ES humaines et des iPS. Il a d'ailleurs été montré que l'injection d'iPS chez ces souris, par voie sous-cutanée ou intra-testiculaire, conduisait à une génération plus rapide et plus efficace de tératomes qu'avec des cellules ES. Les tumeurs se développent en 30 jours environ suite à une injection sous-cutanée d'iPS humaines. Une fois les souris sacrifiées, les tératomes sont analysés par des coupes histologique et des marquages immunohistochimiques dirigés contre des antigènes exprimés par les cellules dérivées des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme, ectoderme) (Blum and Benvenisty, 2008 ; Damjanov, 2005 ; Gutierrez-Aranda *et al.*, 2010).

b. Transmission germinale

En 1984, Bradley et ses collaborateurs ont poussé la caractérisation à un niveau supérieur par une expérience de transmission germinale (Bradley *et al.*, 1984). Pour cela, les auteurs ont injecté des cellules ES murines au sein de blastocystes de souris gestantes, conduisant à la formation de souris chimériques. Cette analyse de pluripotence par transmission germinale est aujourd'hui le test de référence pour mettre en évidence la capacité des cellules ES et des iPS murines à générer tous les types cellulaires chez la souris.

La méthode de transmission germinale n'étant évidemment pas envisageable chez l'homme, c'est donc la formation de tératomes après injection de cellules ES humaines au sein de souris immunodéficientes qui est le test de référence pour la validation de la pluripotence des iPS humaines.

ii. Caractérisation *in vitro*

Les méthodes *in vivo* sont relativement complexes et difficiles à mettre en œuvre. Il existe aujourd'hui de nombreux tests alternatifs *in vitro* permettant d'évaluer la pluripotence.

a. Analyse morphologique

Les iPS peuvent être maintenues dans leur état indifférencié *in vitro* grâce à l'application de conditions de culture particulières. Ces cultures sont classiquement réalisées en adhérence, sur une couche de cellules nourricières ou feeder, généralement des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), permettant la production de facteurs de croissance indispensables à l'auto-renouvellement des cellules pluripotentes. Il existe aussi des méthodes de culture sans cellules feeder, basées sur l'utilisation de matrices de support artificielles telles que la vitronectine ou le Matrigel® (Becton Dickinson). Les milieux de culture contiennent généralement des molécules permettant d'empêcher la différenciation cellulaire, telles que le LIF (Leukemia Inhibitory Factor) pour les iPS ou cellules ES murines ou du bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) pour les équivalents humains (Chen *et al.*, 2014). En culture *in vitro*, les iPS sont caractérisées par la formation de monocouches très denses au centre, et avec des bords bien délimités, semblables à celles formées par les cellules ES. Les cellules sont arrondies et présentent un rapport noyau/cytoplasme élevé. Un allongement des cellules en périphérie des colonies est synonyme de différenciation.

b. Expression de gènes et marqueurs spécifiques de pluripotence

Tout comme les cellules ES, les iPS expriment un ensemble de facteurs de transcription gouvernant la régulation de l'autorenouvellement et le maintien de la pluripotence des cellules. On compte parmi ces marqueurs les facteurs utilisés pour la reprogrammation tels que Oct4, Nanog ou Sox2 mais aussi d'autres protéines situées en aval, telles que Rex1 ou Gdf3, impliquées dans l'auto-renouvellement ou encore TERT et FGF4 (Fibroblast Growth Factor 4), impliqués dans la prolifération cellulaire. On retrouve également à leur surface des antigènes caractéristiques des cellules ES. C'est notamment le cas des protéines de la famille SSEA (Stage-Specific Embryonic Antigen) et TRA (Tumor-Rejection Antigen) (Adewumi *et al.*, 2007 ; Boulting *et al.*, 2011). Les cellules souches pluripotentes sont également caractérisées par un fort niveau d'expression de la phosphatase alcaline

(O'Connor *et al.*, 2008). Grâce à la réalisation d'un immunomarquage à l'aide d'anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes, il est possible de détecter rapidement et efficacement ces marqueurs phénotypiques caractéristiques, intra ou extra cellulaires. L'expression des gènes codant pour ces différents facteurs peut également être appréciée par des mesures par PCR quantitative en temps réel.

c. Formation de corps embryoides *in vitro*

Les iPS sont normalement cultivées en adhérence sans phénomène de différenciation sur une couche de cellules feeder de fibroblastes embryonnaires murins (MEF) ou encore sur des matrices artificielles. Lorsqu'elles sont cultivées en suspension et en l'absence d'agent limitant la différenciation (LIF ou bFGF selon l'espèce), les iPS se développent sous la forme d'agrégats multicellulaires tridimensionnels appelés corps embryoides. Ces agrégats comprennent des cellules de l'endoderme, du mésoderme et de l'ectoderme. Ces tératomes sont ensuite dissociés et différentes analyses peuvent être réalisées afin de mettre en avant les différents types cellulaires par les techniques citées précédemment (mesure des transcrits, immunomarquages, analyses histologiques) (Kurosawa, 2007 ; Sheridan *et al.*, 2012).

d. Analyse du profil épigénétique

Comme nous l'avons vu, la reprogrammation cellulaire est accompagnée d'un remodelage épigénétique visant à restaurer l'expression des gènes de pluripotence propre aux cellules ES. Le profil épigénétique des iPS générées peut alors être comparé à des cellules ES de la même espèce mais aussi aux cellules à partir desquelles elles ont été générées. Les marques généralement recherchées sont la présence des domaines bivalents H3K4me3/H3K27me3 (Bernstein *et al.*, 2006) spécifiques des cellules souches pluripotentes ou une perte de méthylation au niveau des promoteurs des gènes de pluripotence (Maherali *et al.*, 2007), par "CHIP-On-Chip" (Immunoprécipitation de la chromatine couplée à une analyse sur puce à ADN) (Reimer and Turck, 2010) ou un séquençage au bisulfite (Darst *et al.*, 2010), respectivement.

CHAPITRE 4

Développement d'un vecteur non intégratif innovant pour la génération sécurisée d'iPS

I. Objectif du projet

La recherche et le développement sur les iPS est un domaine en pleine expansion depuis maintenant une dizaine d'années et la découverte du Professeur Shinya Yamanaka en 2006.

Depuis, de nombreuses méthodes de reprogrammation ont vu le jour, reposant sur la conception de nouveaux vecteurs. Comme nous l'avons vu précédemment, les méthodes basées sur l'apport de facteurs de transcription embryonnaires exogènes grâce à des rétrovirus ou sous forme d'ARNm semblent les plus efficaces à ce jour. Néanmoins, ces méthodes présentent des risques plus ou moins importants de transformation cellulaire des iPS générées, ce qui est incompatible avec une utilisation clinique de ces cellules. La méthode la plus prometteuse dans l'optique d'obtenir des iPS utilisables en clinique consiste à apporter ces facteurs de reprogrammation directement sous leur forme protéique. Cependant, ces méthodes sont relativement inefficaces à ce jour, en comparaison des premières citées. Cette perte d'efficacité peut être liée à différents paramètres : (i) l'efficacité du vecteur utilisé à pénétrer au sein des cellules à reprogrammer ; (ii) la capacité des facteurs injectés à être adressés jusqu'à leur localisation finale, soit le noyau pour la plupart d'entre eux ; (iii) l'influence du vecteur utilisé sur l'activité des facteurs et donc leur capacité à induire la transcription des gènes de pluripotence. De plus, travailler avec les protéines nécessite des étapes délicates et fastidieuses de production, purification et conservation. Aussi, les protéines représentent un matériel biologique relativement fragile.

Au cours de ce projet, nous avons cherché à proposer une nouvelle stratégie de génération sécurisée d'iPS. Pour cela nous avons cherché à développer et optimiser un nouveau vecteur de protéines, qui soit à la fois efficace et facile à produire et à mettre en application.

Ce projet s'inscrit dans un projet global collaboratif avec l'EFS de Grenoble et l'équipe du Professeur Luc Douay de l'EFS Ile de France. Les iPS obtenues seront utilisées pour réaliser une différenciation érythrocytaire et hématopoïétique avec des objectifs transfusionnels et de thérapie autologue.

L'équipe TheREx du laboratoire TIMC-IMAG est spécialisée dans la conception de vecteurs de protéines pour le développement d'outils diagnostiques et thérapeutiques. Dans cette partie, nous allons aborder les caractéristiques de certains de ces vecteurs, qui seront les différents candidats à évaluer dans la perspective de proposer un nouveau protocole innovant et sécurisé de génération d'iPS.

Ces vecteurs sont de différentes natures. En effet, nous aurons l'opportunité de travailler avec un peptide de transduction dérivée du virus d'Epstein-Barr, une particule pseudo-virale (VLP) issue de l'adénovirus de type 3, ainsi qu'une micro-seringue naturelle portée par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*.

II. Les vecteurs de protéines de l'équipe TheREx

1. Domaine minimal MD11 du virus d'Epstein-Barr

i. Généralités

Le virus d'Epstein-Barr (EBV), de la famille des Herpes viridae, est présent chez 90% de la population mondiale. Il infecte principalement les lymphocytes B mais aussi certaines cellules épithéliales. La primo-infection, souvent contractée au cours de l'enfance, est généralement asymptomatique mais peut également prendre la forme d'une mononucléose infectieuse quand contractée plus tard, en particulier à l'adolescence. La plupart du temps le virus reste en phase de latence et n'est associé à aucun état pathologique. Dans certains cas, le virus est capable d'entrer en phase lytique et d'induire des maladies sévères telles que le lymphome de Burkitt, la maladie de Hodgkin ou encore le cancer du nasopharynx (Amon and Farrell, 2005 ; Young and Rickinson, 2004).

La passage de la phase de latence à la phase lytique est permise grâce au facteur de transcription Zebra du virus (Lieberman *et al.*, 1990). De manière intéressante, il a été montré que la protéine Zebra ajoutée à des cultures de cellules lymphoïdes, infectées ou non par le virus EBV, était capable de pénétrer au sein de ces cellules par un phénomène d'endocytose, sans pour autant activer le cycle lytique du virus (Mahot *et al.*, 2005). Ces données indiquent que la protéine possède des propriétés de pénétration cellulaire, phénomène similaire à ce qui a été observé avec le facteur de transcription Tat du virus

HIV (Frankel and Pabo, 1988 ; Green and Loewenstein, 1988) ou l'homéodomaine antennapedia de la drosophile (Joliot *et al.*, 1991) .

La structure de Zebra est présentée en Figure 11. Ce facteur de transcription interagit avec ses séquences cibles grâce à un domaine de type Leucine-Zipper basique (bZIP), situé en position C-terminale (acides aminés 170-228). Ce domaine peut lui-même être subdivisé en deux parties : (i) un domaine basique (DB, acides aminés 178-195), interagissant avec l'ADN ; (ii) un motif Leucine-Zipper (DIM, acides aminés 196-228), permettant la dimérisation du facteur de transcription. Le domaine de trans-activation (TAD) est quant à lui situé dans la partie N-terminale (acides aminés 1-140).



Figure 11. Représentation schématique de la séquence protéique de la Zebra. TAD : domaine de trans-activation ; DB : région basique ou motif de liaison à l'ADN ; DIM : motif Leucine-Zipper ou domaine de dimérisation ; bZIP (DB+DIM) : domaine Leucine-Zipper basique

ii. Caractérisations de la séquence minimale de pénétration cellulaire MD11

Les travaux du groupe du Professeur Lenormand au sein de l'équipe TheRex ont permis, à partir de la séquence de la protéine Zebra, d'identifier les régions impliquées dans la pénétration cellulaire de la protéine. Neuf formes tronquées de Zebra ont été produites, purifiées et enfin étudiées pour leur capacité à pénétrer au sein de différentes lignées cellulaires. L'efficacité a été évaluée grâce à l'utilisation de la GFP comme protéine cargo reportrice (Rothe *et al.*, 2010). Le domaine minimal et optimal identifié est constitué des acides aminés 178 à 220 de la protéine, comprenant ainsi la partie basique correspondant au domaine de fixation à l'ADN ainsi qu'une bonne partie du motif Leucine-Zipper. Ce

domaine minimal, 11^{ème} version du genre, porte ainsi le nom de MD11. Il ne présente aucun caractère infectieux.

iii. Mécanisme de pénétration cellulaire

La première étape conduisant à l'entrée de MD11 au sein des cellules est l'interaction avec les héparane sulfates chargés négativement au niveau membranaire, grâce au caractère basique de la séquence MD11 (Rothe *et al.*, 2010). Ce mécanisme semble d'ailleurs partagé entre les différents CPP riches en acides aminés basiques, tels que Tat ou la pénétratine (Suzuki *et al.*, 2002).

Ensuite, contrairement à la plupart des CPP, pénétrant principalement dans les cellules par différents mécanismes d'endocytose et de macropinocytose (Kaplan *et al.*, 2005 ; Nakase *et al.*, 2004 ; Richard *et al.*, 2003, 2005), MD11 utilise plutôt un processus de translocation directe via la bicouche lipidique, en grande partie énergie-indépendant.

En effet, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques, il a été montré que le processus d'internalisation de MD11 était différent de mécanismes d'endocytoses clathrine ou cavéoline-dépendants et ne correspondait pas non plus à de la macropinocytose. En revanche, l'internalisation semble également liée, de manière très minoritaire, à un phénomène d'endocytose dépendant des rafts lipidiques. Il a été estimé que le phénomène de translocation directe était à l'origine de 60% des protéines internalisées (Rothe *et al.*, 2010). Cette translocation directe implique une déstabilisation et une réorganisation transitoire de la bicouche lipidique (Lundberg and Langel, 2003).

D'autre part, une diminution importante de la concentration intracellulaire en ATP ne résulte qu'en une réduction modérée de l'activité de translocation de MD11, soulignant le fait que ce mécanisme est principalement énergie-indépendant (Rothe *et al.*, 2010).

L'internalisation de protéines par des mécanismes d'endocytose et de macropinocytose conduit la plupart du temps à un adressage vésiculaire vers des endosomes primaires puis tardifs, et enfin vers des lysosomes où les protéines sont dégradées, notamment par un mécanisme d'acidification (Conner and Schmid, 2003 ; Fischer *et al.*, 2004). Cette voie d'internalisation est un véritable frein au transport de molécules biologiques actives par les CPP.

D'ailleurs, les vecteurs de protéines les plus largement utilisés à l'heure actuelle pour la génération d'IPS, à savoir les domaines poly-arginines (R9 ou R11), semblent eux aussi pénétrer au sein des cellules préférentiellement par un mécanisme d'endocytose (Richard *et al.*, 2003), bien que des travaux préalables avaient mis en avant un mécanisme d'entrée différent (Mitchell *et al.*, 2000).

Ce mécanisme de translocation directe observé avec MD11 semble donc un atout indéniable dans l'objectif de vectoriser des facteurs de transcription qui doivent être actifs afin d'induire l'expression des gènes de pluripotence.

iv. Applications

Les premiers travaux de l'équipe du Professeur Lenormand au laboratoire ont permis de mettre en avant que ce CPP dérivé du virus EBV était capable de pénétrer au sein de différents types cellulaires, grâce à l'utilisation de protéines reportrices couplées telles que la GFP ou la bêta-galactosidase au sein de différents types cellulaires (cellules épithéliales, cellules osseuses).

Ces premières observations ont ensuite été mises à profit dans l'optique d'utiliser ce vecteur comme outil de transport de molécules à visée thérapeutique.

Récemment, il a été montré par les membres de l'équipe TheREx que MD11 était capable de transporter des protéines nucléaires (Marchione *et al.*, 2015). Pour cela, les auteurs ont vectorisé, via MD11, la sous-unité f du facteur d'initiation eucaryote 3 (eIF3f) au sein de différentes lignées tumorales humaines et murines. Eif3f, dont l'expression est fortement diminuée dans de nombreux cancers, induit un blocage de l'initiation de la traduction. Par cette stratégie, les auteurs ont réussi à restaurer une activité eIF3f au sein de ces cellules tumorales et à induire la mort cellulaire. Cet effet cytotoxique est observé dès 1h après traitement pour la plupart des lignées, soulignant un adressage nucléaire rapide du facteur.

Ces résultats sont extrêmement importants et intéressants pour notre projet puisqu'ils démontrent qu'il est possible de transporter des protéines à finalité nucléaire sous leur forme active, l'adressage nucléaire étant relativement rapide une fois la protéine fusionnée à MD11 internalisée. Ceci souligne une fois de plus le potentiel de ce vecteur dans l'optique de vectoriser des facteurs de transcription, exerçant eux aussi leur activité au sein du noyau des cellules.

En outre, il a également été montré par des travaux de l'équipe TheREx que ce peptide de transduction était capable de transporter efficacement des protéines au sein de la levure *Candida albicans*. Ces résultats sont d'autant plus spectaculaires quand on sait que la structure de la paroi des levures est extrêmement complexe et que les molécules utilisées actuellement ne la franchissent que partiellement. Ceci laisse ainsi envisager le développement de nouvelles thérapies antifongiques basées sur l'utilisation de MD11 comme vecteur.

En résumé, MD11 est un CPP très efficace capable de transporter des protéines actives au sein de nombreux types cellulaires humains mais aussi de levures. Grâce à son mécanisme de translocation directe, il peut transporter des protéines nucléaires, avec un adressage rapide, sans modifier leur localisation ou leur efficacité. Toutes ces caractéristiques sont très importantes dans une perspective d'utilisation en reprogrammation cellulaire.

2. Dodécaèdre de l'adénovirus de type 3

i. Généralités

Les adénovirus (Ad) sont une famille de virus à ADN double brin non enveloppés. Ils sont associés à des pathologies respiratoires, gastroentériques et oculaires chez de nombreux vertébrés, dont l'homme. Ils possèdent un génome de 36 kpb enfermé au sein d'une capside icosaédrique constituée de trois protéines majoritaires : la base du penton, la fibre et l'hexon (Figure 12a).

La base du penton et la fibre sont impliquées dans l'attachement et la pénétration cellulaire du virus.

La fibre est une protéine trimérique impliquée dans l'attachement aux cellules cibles. Elle interagit avec les récepteurs de type CAR à la surface des cellules épithéliales présentes au niveau des jonctions serrées (Cohen *et al.*, 2001 ; Roelvink *et al.*, 1998).

La base du penton est une protéine pentamérique, impliquée dans l'internalisation du virus au sein des cellules épithéliales. Cette internalisation prend la forme d'une endocytose clathrine-dépendante, suite à l'interaction entre le motif RGD de la base du penton et les intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$ à la surface de ces cellules. (Varga *et al.*, 1991 ; Wickham *et al.*,

1993). Suite à son internalisation, l'Ad subit une série de désassemblages le conduisant jusqu'à la membrane nucléaire, où son génome peut être libéré au sein du noyau de la cellule hôte. C'est la base du penton qui est responsable de ce mécanisme, en induisant l'échappement des vésicules d'endocytose ainsi que la décapsidation de l'ADN viral. Cet échappement serait lié à l'acidification de l'endosome induisant un changement de conformation de la base du penton, responsable d'un remodelage de la membrane plasmique (Greber *et al.*, 1993 ; Seth, 1994).

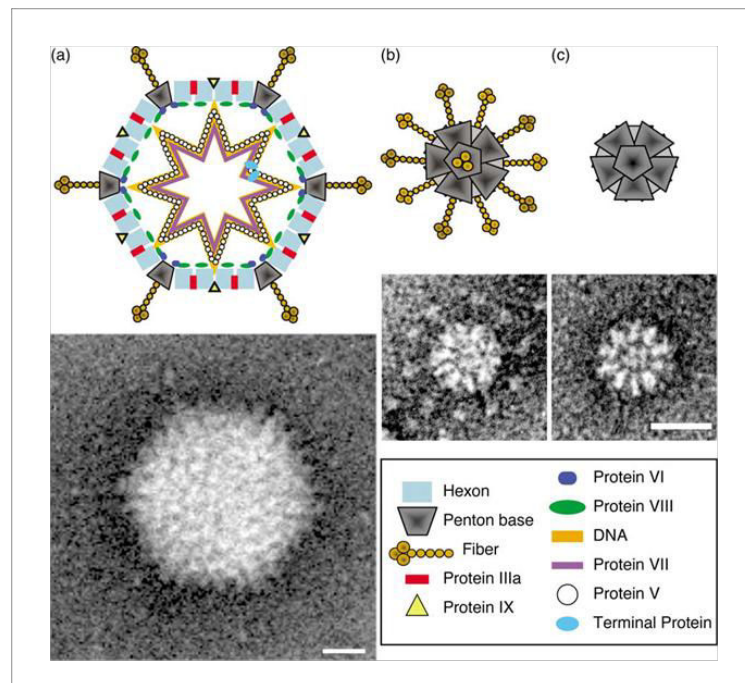


Figure 12. Représentations schématiques des structures de l'adénovirus (a) et des dodécaèdres fibre (b) et base (c) (Fuschiotti *et al.*, 2006). Les images de microscopie électronique correspondantes sont présentées en dessous.

Contrairement à la plupart des adénovirus, l'adénovirus de type 3 (Ad3) est capable de former des Virus-Like Particles (VLP), constituées de la base du penton. Cette structure est appelée dodécaèdre (Dd), puisqu'elle est constituée de 12 bases du penton. Elle peut exister sous deux formes, selon la présence ou non de la fibre : le dodécaèdre fibre (DF) ou le dodécaèdre base (DB), respectivement (Figure 12b et Figure 12c). Pour le DF, une fibre est attachée de manière non covalente à chaque base du penton, le complexe comprenant ainsi 12 bases du penton et 12 fibres (Fender *et al.*, 1997, 2005).

L'Ad3 fait partie du sous-groupe B et possède la particularité d'interagir avec les cellules épithéliales différemment des autres adénovirus. En effet, via sa fibre, il interagit avec le récepteur Desmogléine-2 et non pas avec un récepteur de type CAR (Wang *et al.*, 2011a).

ii. Caractéristiques du Dd de l'Ad3

Comme indiqué précédemment, le Dd de l'Ad3 est un assemblage de 12 bases du penton auquel peut être associée la fibre (DB et DF, respectivement). Le fait de pouvoir produire le Dd en système baculovirus grâce à l'expression de la base du penton avec ou sans la fibre, souligne le fait qu'aucun autre élément viral n'est nécessaire à la formation de cette particule (Fender *et al.*, 1997).

Contrairement à l'Ad3, capable de pénétrer au sein de cellules épithéliales, le Dd possède un tropisme beaucoup plus large. En effet, il a été montré que cet assemblage protéique était capable d'interagir avec les glycosaminoglycanes de type héparane sulfate présents à la surface des cellules eucaryotes, lui permettant ainsi de pénétrer au sein de nombreux types cellulaires (Vivès *et al.*, 2004).

Bien que les DF et DB soient tous les deux internalisés au sein d'une grande variété de types cellulaires, l'internalisation du DF semble supérieure dans les cellules épithéliales. Cette différence d'efficacité est probablement liée à l'association entre la fibre et la Desmogléine-2 à la surface de ces cellules.

iii. Utilisation du Dd de l'Ad3 comme vecteur de protéines

Il a été montré que le Dd, via la base du penton, est capable d'interagir spécifiquement avec des domaines présents sur les ubiquitines ligases, les domaines WW. Les domaines WW, sont caractérisés par la présence de 2 résidus tryptophanes conservés espacés de 20 à 22 acides aminés. Ces domaines riches en tryptophane et proline sont présents sur de nombreuses ubiquitine-ligases de levures (Rsp5) et humaines (Nedd4, WWP1 et WWP2) (Figure 13A).

L'interaction avec les domaines WW est permise grâce à la présence de deux motifs PPxY spécifiques, riche en proline, situés dans la partie N-terminale de la base du penton (Figure 13B). Ces motifs font 5 acides aminés et sont séparés l'un de l'autre par 20 résidus. Les

domaines WW forment un tonneau β interagissant de manière non covalente avec l'hélice α riche en proline contenant les domaines PPxY (Galinier *et al.*, 2002).

Cette interaction entre les domaines WW et la base du penton a été mise à profit par plusieurs équipes Grenobloises dans l'optique d'utiliser les domaines WW comme adaptateurs de protéines d'intérêt pour le transport intracellulaire via le Dd. L'idée était de créer une protéine chimère entre les domaines WW et la séquence peptidique d'intérêt, l'ensemble pouvant alors se lier au Dd.

Des premiers travaux réalisés par l'équipe du Docteur Chroboczek ont démontré qu'il était possible de transporter une protéine d'intérêt, en l'occurrence la Maltose Binding Protein (MBP), au sein de cellules humaines, avec seulement 3 des 4 domaines WW de Nedd4, à savoir WW2, WW3 et WW4 (WW_{2,3,4}) (Garcel *et al.*, 2006). Plus récemment, les travaux du groupe du Professeur Lenormand dans notre équipe ont montré qu'un seul des 3 domaines de Nedd4, à savoir WW3, était nécessaire et suffisant pour permettre le transport de protéines d'intérêt via le Dd (Figure 13C, D). Les auteurs ont montré, grâce à l'utilisation de la GFP comme protéine cargo, que l'internalisation de WW3-GFP était comparable à celle de la GFP couplée aux 3 domaines. (Villegas-Méndez *et al.*, 2012).

Etant donné que le Dd possède 12 bases du penton et que chacune des cinq sous-unités de la base du penton peut interagir avec un domaine WW, il est possible de transporter jusqu'à 60 protéines d'intérêt par Dd. D'autre part, le Dd est capable de transporter des protéines complexes telles que des immunoglobulines (Fender *et al.*, 2003).

Il est également intéressant de noter que le Dd est capable de transporter des molécules biologiques très diverses parmi lesquelles on compte des petites molécules chimiques comme des antibiotiques (Zochowska *et al.*, 2009) mais aussi des ARNm (Zochowska *et al.*, 2015).

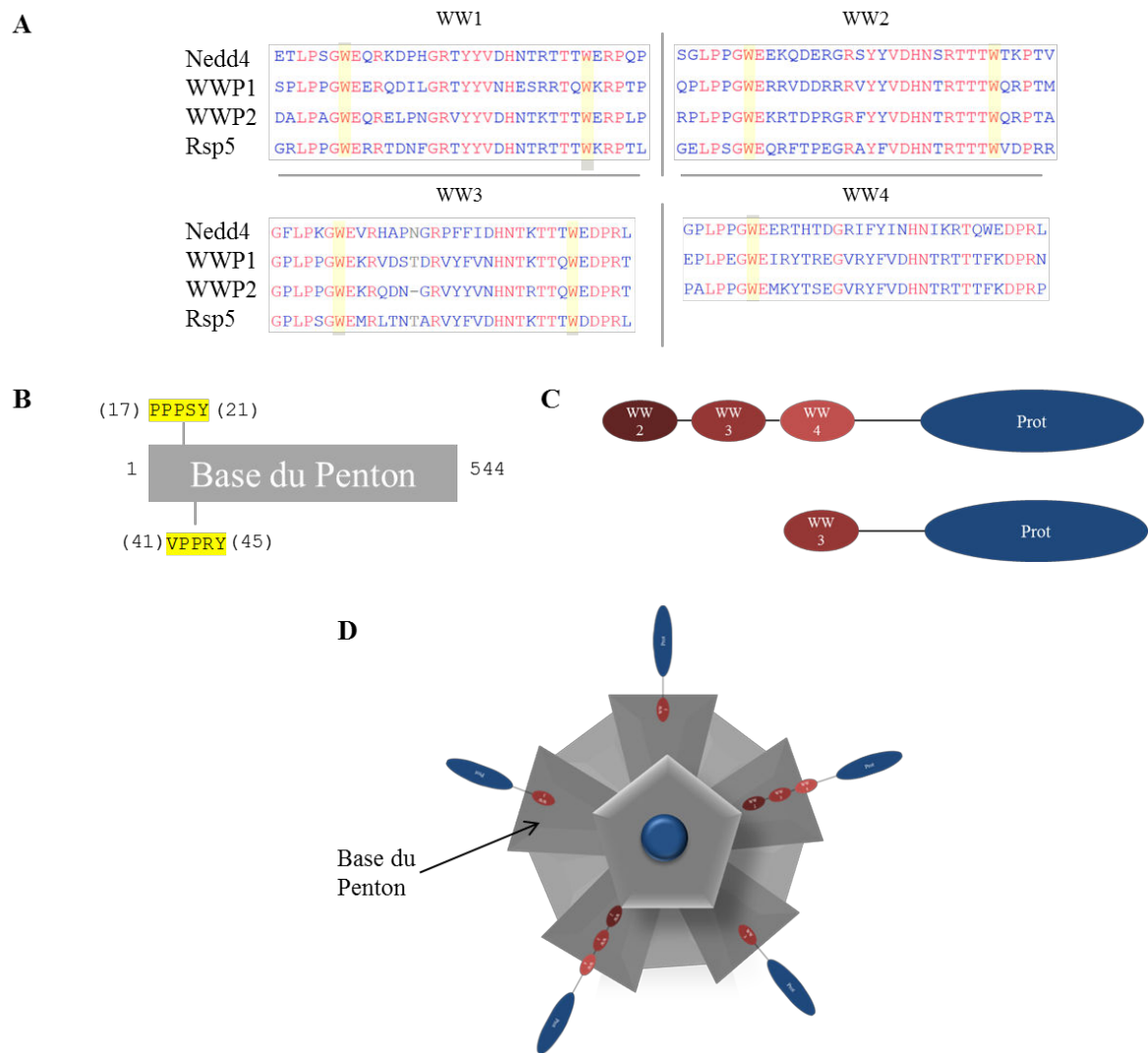


Figure 13. Interaction entre le Dd et les domaines WW des ubiquitine-ligases. (A) Séquences peptidiques des domaines WW de différentes ubiquitine-ligases. Les résidus tryptophane conservés sont surlignés en jaune. Les résidus identiques pour les différentes protéines sont en rouge. (B) Représentation schématique de la base du penton avec en jaune les séquences peptidiques des deux domaines PPxY. (C) Représentation schématique des domaines WW_{2,3,4} ou WW₃ associés à une protéine d'intérêt (Prot). (D) Association des constructions WW_{2,3,4}-Prot ou WW₃-Prot avec le Dd au niveau de la base du penton.

iv. Applications développées à partir du Dd

Grâce à cette capacité à transporter des protéines couplées aux domaines WW, le Dd a été employé pour différentes applications *in vitro* et *in vivo*.

En 2010, le Dd a été utilisé dans un protocole d'immunothérapie anti tumorale prophylactique et thérapeutique *in vivo*. Les auteurs ont ainsi réussi à induire la production de lymphocyte T CD8⁺ au sein d'un modèle murin de mélanome B16 qui exprime

l'antigène Ova (B16-Ova). Pour cela les auteurs ont injecté le Dd couplé à l'antigène Ova associé aux domaines WW_{2,3,4} de Nedd4. En prophylaxie, la grande majorité des souris immunisées n'ont pas développé de tumeur. En curatif, 90% des souris traitées ont survécu (Villegas-Mendez *et al.*, 2010).

Plus récemment, Nakalska et ses collaborateurs ont démontré que le Dd couplé à un antigène pouvait être utilisé comme vaccin (Naskalska *et al.*, 2009). Les VLP recombinantes sont aujourd'hui un outil de choix dans le développement de vaccins. Ces vaccins recombinants sont d'ailleurs déjà utilisés pour l'immunisation contre certains virus tels que les virus des hépatites B et E ou le Papillomavirus humain. Les VLP permettent d'obtenir une stimulation du système immunitaire proche de celle induite par les virus inactivés mais ne présentent aucun caractère infectieux (Zhao *et al.*, 2013). Ces particules constituent ainsi une alternative intéressante aux vaccins conventionnels, rapide et moins coûteuse en terme de production, et sécurisée. Pour réaliser cette preuve de concept, les auteurs ont incubé des cellules dendritiques humaines, purifiées à partir de sang périphériques de patients sains, avec le Dd associé à différents épitopes de l'antigène M1 du virus de la grippe, couplés aux domaines WW_{2,3,4} de Nedd4 ou WW_{1,2,3} de Rsp5. Les cellules dendritiques activées ont permis d'induire *in vitro* l'activation et la prolifération de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'antigène, également purifiés à partir de sang périphérique de patients sains (Naskalska *et al.*, 2009). Ces résultats démontrent que le Dd est également une VLP possédant un fort potentiel dans ce domaine. De plus il est possible d'immuniser contre différents agents infectieux en adaptant différents antigènes sur le Dd via les domaines WW.

Enfin, il est très important de noter que comme pour le peptide Tat, le Dd ainsi que les protéines transportées semblent s'accumuler au niveau de l'espace péri nucléaire grâce à un transport le long du cytosquelette d'actine. De plus, il a été montré que la vectorisation de p53 via le Dd permettait d'induire efficacement l'apoptose au sein de lignées de carcinomes humain (Villegas-Méndez *et al.*, 2012). Ces données indiquent que le Dd est un vecteur tout à fait adapté au transport intracellulaire de protéines exerçant une activité au niveau nucléaire, ce qui est le cas des facteurs de transcription embryonnaires.

En conclusion, le Dd semble un vecteur très prometteur dans l'objectif d'améliorer l'efficacité des protocoles de génération sécurisée d'iPS par transfert de protéines. En effet, il ne possède aucun matériel génétique viral et ne présente donc aucun risque infectieux. D'autre part, il possède une capacité de chargement de protéines cargo considérable, il présente un tropisme large ainsi qu'une capacité à transporter des protéines nucléaires actives. En outre, sa faculté à s'échapper des vésicules d'endocytose via la base du penton laisse imaginer une dégradation modérée des protéines internalisées via ce vecteur.

3. Système de sécrétion de type 3 de *Pseudomonas aeruginosa*

i. Généralités sur la bactérie

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) est une bactérie responsable d'infections opportunistes chez les patients immunodéprimés, notamment chez les sujets souffrant du SIDA, de neutropénie consécutive à une chimiothérapie, de certaines dérégulations métaboliques mais aussi ceux ayant reçu une greffe de moelle osseuse ou encore les grands brûlés (Lyczak *et al.*, 2000). Elle est également l'une des causes majeures d'infections pulmonaires rencontrées par les patients souffrant de mucoviscidose. Enfin, elle est responsable de 10 à 15% des infections nosocomiales (Blanc *et al.*, 1998).

Cette bactérie colonise facilement de nombreux environnements tels que les plantes et les sols, grâce notamment à sa capacité à utiliser de nombreuses sources énergétiques (Bland *et al.*, 1976 ; Green *et al.*, 1974). En outre, elle développe rapidement des résistances aux traitements antibiotiques grâce à des systèmes de pompes à efflux mais aussi à la perméabilité sélective de sa membrane externe (Hancock and Speert, 2000).

P. aeruginosa possède un véritable arsenal de facteurs de virulence, cellulaires et extracellulaires. Parmi ces facteurs, on retrouve des molécules impliquées dans l'adhésion cellulaire, la motilité de la bactérie, l'invasion, la cytotoxicité, la dissémination systémique en encore l'échappement au système immunitaire (pour une revue, voir Strateva and Mitov, 2011). Les principaux facteurs de virulence sont présentés dans le Tableau 11.

Tableau 11. Principaux facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa*

Facteurs de virulence	Type	Fonctions	Références
Alginate (exopolysaccharide)	Cellulaire	- Constituant du biofilm - Réduction de la phagocytose par les macrophages	Leid <i>et al.</i> , 2005
Flagelle	Cellulaire	- Motilité - Adhésion cellulaire - Favorise la formation de biofilm - Stimule la voie TLR5 conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires	Feldman <i>et al.</i> , 1998 ; O'Toole and Kolter, 1998
Lectines A et B (Lec A et Lec B)	Cellulaire	- Adhésion cellulaire - Perméabilisation des cellules épithéliales pulmonaires - Favorisent la pénétration cellulaire de l'ETA	Chemani <i>et al.</i> , 2009
Lipopolysaccharide (LPS)	Cellulaire	- Constituant majeur de la membrane externe - Stimule la voie TLR4 conduisant à la production de cytokines pro-inflammatoires - Protection contre la phagocytose	Pier, 2007 ; Raoust <i>et al.</i> , 2009
Pilus de Type IV (Famille des Adhésines)	Cellulaire	- Motilité - Adhésion aux cellules épithéliales	Burrows, 2012 ; Hahn, 1997
Système de sécrétion de Type III (SST3)	Cellulaire	- Injection des exotoxines ExoS, ExoT, ExoY, ExoU - Formation de pores induisant une perméabilisation cellulaire aux ions et petites molécules. - Induit la nécrose des macrophages	Dacheux <i>et al.</i> , 2001 ; Faudry <i>et al.</i> , 2006 ; Galle <i>et al.</i> , 2012 ; Hauser, 2009
Cytotoxine	Extracellulaire	- Formation de pores dans la membrane plasmique des cellules cibles - Augmentation de la perméabilité cellulaire	Sliwinski-Korell <i>et al.</i> , 1999 ; Xiong <i>et al.</i> , 1994
Elastases (Las A et Las B)	Extracellulaire	Destruction tissulaire par protéolyse et elastolyse (dégradation de l'élastine)	Galloway, 1991 ; Toder <i>et al.</i> , 1994
Exotoxine A (ETA)	Extracellulaire	Inactivation du facteur d'élongation de la traduction 2 (eEF2) par ADP-Ribosylation, conduisant à l'arrêt de la synthèse protéique	Beattie <i>et al.</i> , 1996
Exotoxine S (ExoS) (SST3)	Extracellulaire (SST3)	- Inhibition de Ras par ADP Ribosylation, conduisant à l'apoptose cellulaire en 3h - Remodelage du cytosquelette d'actine - Empêche la phagocytose par les macrophages	Deng and Barbieri, 2008 ; Frithz-Lindsten <i>et al.</i> , 1997 ; Kaufman <i>et al.</i> , 2000 ; Pederson and Barbieri, 1998
Exotoxine T (ExoT) (SST3)	Extracellulaire (SST3)	- Induit l'arrêt du cycle cellulaire par ADP-Ribosylation de Crk1, conduisant à l'apoptose des cellules en 10h - Remodelage du cytosquelette	Deng and Barbieri, 2008 ; Shafikhani <i>et al.</i> , 2008

		d'actine à l'origine d'une dégradation de la barrière épithéliale	
Exotoxine U (ExoU)	Extracellulaire (SST3)	<ul style="list-style-type: none"> - Phospholipase induisant une perte d'intégrité membranaire conduisant à la nécrose cellulaire en moins de 2h - Favorise la dissémination en détruisant les cellules phagocytaires 	Phillips, 2003 ; Sato <i>et al.</i> , 2003 ; Shaver and Hauser, 2004
Exotoxine Y (ExoY)	Extracellulaire (SST3)	<ul style="list-style-type: none"> - Activité adénylate-cyclase - Modification du cytosquelette d'actine conduisant à un arrondissement des cellules mais non toxique - Semble réduire l'activité de phagocytose par les neutrophiles 	Beckert <i>et al.</i> , 2014 ; Cowell <i>et al.</i> , 2005 ; Yahr <i>et al.</i> , 1998
Phospholipase C hémolytique	Extracellulaire	<ul style="list-style-type: none"> - Induit une perméabilisation vasculaire favorisant la dissémination - Lésions tissulaires 	Berk <i>et al.</i> , 1987 ; Meyers <i>et al.</i> , 1992
Rhamnolipide	Extracellulaire	<ul style="list-style-type: none"> - Effet détergeant - Destruction des jonctions serrées des cellules épithéliales participant à l'invasion tissulaire - Induit la nécrose des macrophages 	Jensen <i>et al.</i> , 2007 ; Zulianello <i>et al.</i> , 2006

Cette bactérie possède six systèmes de sécrétion (SST1 à SST6), capables de sécréter des exoprotéines toxiques (Bleves *et al.*, 2010). Les SST3 et SST6 présentent la particularité de pouvoir injecter des protéines directement dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Le SST3 est considéré comme un système de virulence majeur de la bactérie, de par sa capacité à injecter des exotoxines ou exoenzymes dans les cellules cibles, pouvant induire la mort cellulaire en 2h. Il existe quatre exotoxines sécrétées via le SST3 : ExoS, ExoU, ExoT et ExoY (Hauser, 2009). Il est important de noter que toutes les souches connues possèdent soit ExoS soit ExoU mais jamais les deux en même temps (Feltman *et al.*, 2001). En dehors de la cytotoxicité liée aux exotoxines injectées, le SST3 présente également une cytotoxicité qui lui est propre, liée à : (i) la formation de pores au sein de la membrane plasmique des cellules conduisant à une perméabilisation puis à une mort cellulaire (activité "pore-forming") (Dacheux *et al.*, 2001) ; (ii) une activité nécrotique pro-inflammatoire de la protéine PopB (Galle *et al.*, 2012). Ces deux phénomènes ont été observés sur des macrophages.

Grâce à tous ses facteurs, *P. aeruginosa* est capable d'échapper à l'élimination par le système immunitaire en inhibant l'activité des cellules NK (Pedersen and Kharazmi, 1987) ainsi que la phagocytose par les macrophages (Leid *et al.*, 2005) ou en induisant la mort cellulaire des polynucléaires neutrophiles (Dacheux *et al.*, 1999), des cellules épithéliales (Shafikhani *et al.*, 2008), des cellules endothéliales (Valente *et al.*, 2000) ainsi que des lymphocytes T (Bruno *et al.*, 2000). L'infection par *P. aeruginosa* est d'abord caractérisée par un attachement de la bactérie au niveau des cellules épithéliales des épithéliums polarisés (Bucior *et al.*, 2010). Par la suite, la bactérie peut envahir les tissus de manière locale ou systémique, sous la forme d'une infection aigue ou chronique.

De nombreux facteurs de virulence de la bactérie, et notamment le SST3, sont régulés, en partie, par un mécanisme de contrôle de la densité dit de "Quorum Sensing" (QS). Il implique deux couples de facteurs de transcription chez *P. aeruginosa* : LasI/LasR et RhII/RhlR. Il a d'ailleurs été montré que la délétion des gènes codant ces protéines réduisait considérablement la virulence de la bactérie (Pearson *et al.*, 2000). Les gènes du QS sont activés en phase de croissance, avec un pic d'expression observé en phase stationnaire, lorsque la densité bactérienne est maximale (Venturi, 2006). Lors d'une phase d'infection aigue, caractérisée par une densité bactérienne importante, le QS est à l'origine d'une surexpression de facteurs de virulence extracellulaires par la bactérie. La formation de biofilms, caractéristique d'une infection chronique, est également lié à ce système (Van Delden and Iglewski, 1998). Ainsi, ce mécanisme de signalisation est étroitement lié au type d'infection causé par *P. aeruginosa*.

ii. Fonctionnement du SST3

Le système de sécrétion de type III, également appelé injectisome, est une véritable micro-seringue naturelle portée par une trentaine de microorganismes différents, parmi lesquels on compte des pathogènes pour l'homme (*Salmonella enterica*, *Yersinia pestis*, *Burkholderia pseudomallei*), des pathogènes de plantes (*Pseudomonas syringae*) ou encore de souris (*Citrobacter rodentium*) (Cornelis, 2006). Le SST3 de *P. aeruginosa* est capable d'injecter des exotoxines directement dans le cytoplasme des cellules cibles. Ces exotoxines sont à l'origine d'une cytotoxicité importante. Cette structure extrêmement complexe (c'est le système de sécrétion le plus complexe de *P. aeruginosa*) est codée par au moins 41 gènes, dont 36 sont répartis sur cinq opérons, et regroupent différents types de

protéines : (i) les régulateurs transcriptionnels des gènes du SST3, (ii) les protéines formant le complexe de sécrétion, (iii) les protéines formant le complexe de translocation, (iv) les protéines effectrices, (v) les chaperones translocatrices des effecteurs (Figure 14).

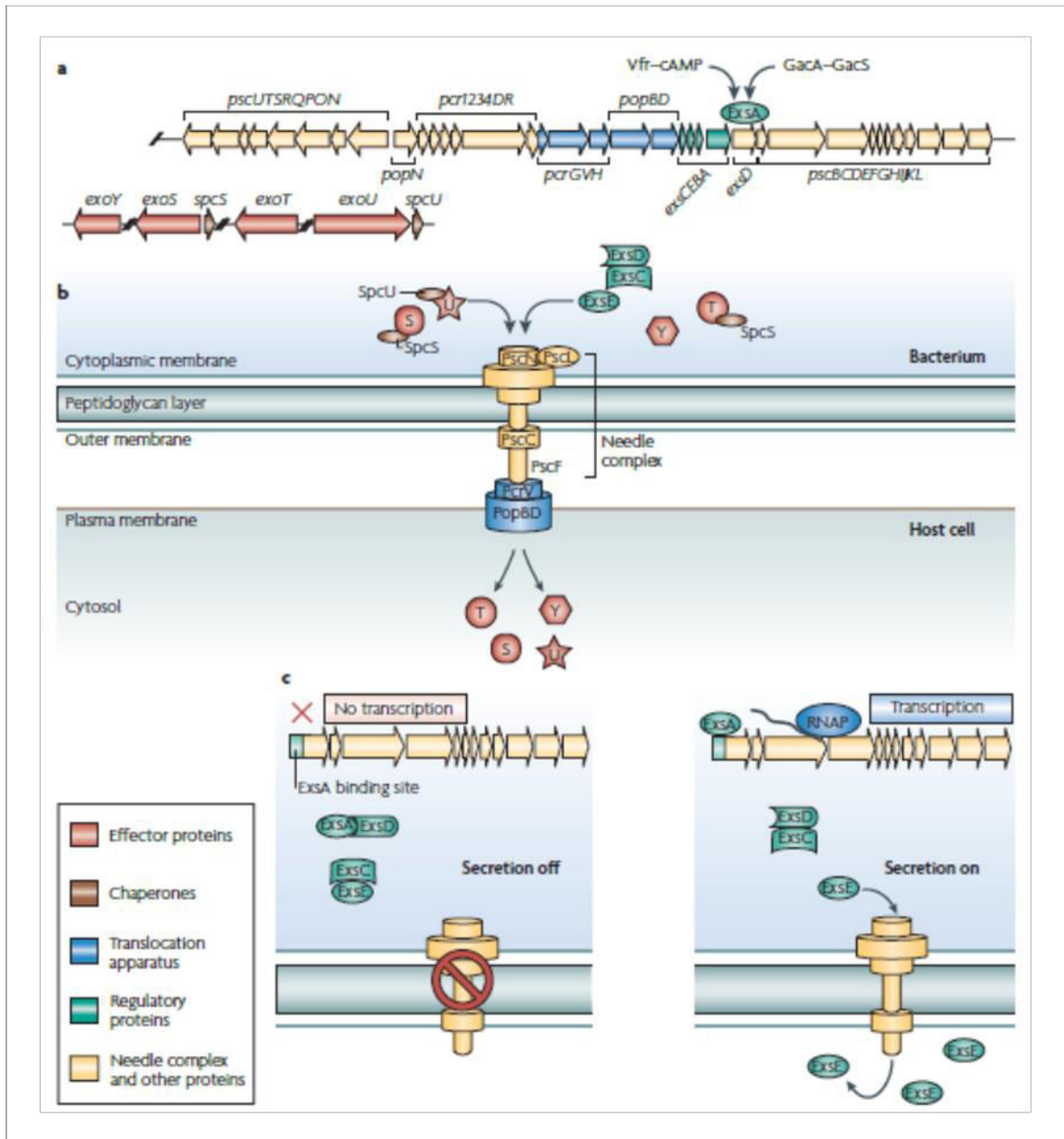


Figure 14. Aperçu de la structure et du fonctionnement du SST3 de *Pseudomonas aeruginosa*. (Hauser, 2009). (a) Les différents gènes codants pour les éléments du SST3 sont répartis sur plusieurs opérons au sein du génome de la bactérie. (b) Structure du complexe de sécrétion et translocation des exotoxines grâce aux différentes chaperones. (c) Mécanisme d'activation de la transcription des gènes du SST3 par ExsA. (exo: exotoxine ; RNAP : ARN Polymérase ; S : ExoS ; T : ExoT ; U : ExoU ; Y : ExoY).

a. Les régulateurs transcriptionnels du SST3

La régulation de l'expression et de l'activité du SST3 est un processus extrêmement complexe. Le régulateur principal des gènes du SST3 est ExsA, capable de se lier au niveau des promoteurs de tous les gènes du SST3. L'activation d'ExsA est dépendante d'une boucle d'activation impliquant 4 protéines : ExsC, ExsD, ExsE et bien sûr ExsA.

Le SST3 est toujours présent à un niveau basal, sous un état inactif/fermé. La surexpression des gènes du SST3 ainsi que l'activation/ouverture du SST3 sont induites par trois conditions différentes : (i) le contact avec une cellule eucaryote, (ii) une déplétion en ions calcium Ca^{2+} ou encore la présence de sérum (iii). Bien que le mécanisme exact conduisant à l'activation transcriptionnelle des gènes du SST3 par ExsA ne soit pas complètement élucidé, cette activation est dépendante de l'état du SST3, et plus précisément du passage de ce dernier d'un état inactif/fermé vers un état actif/ouvert. Il existe ainsi un lien direct entre la sécrétion et la transcription. Cette transition serait liée à une augmentation intracellulaire de l'AMP cyclique (AMPC) (Yahr and Wolfgang, 2006).

Dans des conditions inhibant la sécrétion, c'est ExsD qui, en interagissant avec ExsA, bloque l'activation de l'expression des gènes du SST3 (McCaw *et al.*, 2002). Au contraire, dans des conditions induisant l'activation du SST3 (contact de la bactérie avec sa cellule cible, déplétion en ions Ca^{2+} , présence de sérum), le régulateur négatif ExsD est lié à ExsC, ce complexe étant incapable d'interagir avec ExsA, qui peut alors jouer son rôle d'activateur transcriptionnel (Dasgupta *et al.*, 2004). Dans des conditions de répression de la sécrétion, ExsC est lié à ExsE et ne peut pas jouer son rôle d'anti-inhibiteur sur ExsD ; lors d'un signal d'activation, ExsE est sécrété via le SST3 et la cascade d'activation d'ExsA et donc des gènes du SST3 est alors déclenchée (Urbanowski *et al.*, 2005).

b. Les protéines du complexe de sécrétion

Le complexe de sécrétion, appelé également aiguille, comprend l'ensemble des protéines formant le système capable de transporter les exotoxines de l'intérieur de la bactérie vers l'environnement extracellulaire. Cette structure mesure entre 60 et 120 nm de long pour 6 à 10 nm de large. Il peut être subdivisé en deux parties : (i) une structure basale, comprenant différentes protéines, permettant l'ancrage et la formation d'un canal au sein de la paroi de la bactérie, qui n'ont pour l'instant été que très peu étudiées chez *P. aeruginosa*

(Hauser, 2009) ; (ii) une structure en forme d'aiguille, constitué par la protéine PscF, permettant d'acheminer les effecteurs au niveau extracellulaire (Pastor *et al.*, 2005).

c. Les protéines du complexe de translocation

Les protéines du complexe de translocation ou pore constituent le "bout de l'aiguille" du système, et sont directement impliquées dans la perméabilisation de la membrane plasmique des cellules eucaryotes, permettant le passage des exotoxines transportées via le complexe de sécrétion. Le complexe est constitué de trois protéines : PopB, PopD, et PcrV. PopB et PopD sont les deux protéines formant le pore à proprement parler. PcrV joue un rôle d'adaptateur pour ces deux protéines sur PscF au bout de l'appareil de translocation. Ces protéines sont elles-mêmes sécrétées via le SST3, puis assemblées dans l'environnement extracellulaire (Faudry *et al.*, 2006 ; Goure *et al.*, 2004).

d. Les effecteurs du SST3

Comme nous l'avons abordé précédemment, le SST3 de *P. aeruginosa* est capable d'injecter quatre exotoxines (ExoS, ExoT, ExoU et ExoY), éléments majeurs de l'arsenal de virulence de cette bactérie.

ExoS et ExoT présentent 76% d'homologie et sont caractérisées par la présence d'un domaine RhoGAP (Rho GTPase Activating Protein, domaine impliqué dans l'activation des réactions GTPase) en position N-terminale et d'un domaine ADP-Ribosyltransferase (catalyse le transfert d'un groupe ADP-Ribose d'un NAD⁺ sur les protéines eucaryotes) en position C-terminale. Ces deux protéines sont responsables d'une mort cellulaire par apoptose en 2h ou 10h, respectivement. (Deng and Barbieri, 2008 ; Hauser, 2009 ; Shaver and Hauser, 2004). Parmi les toxines injectées, c'est l'exotoxine U (ExoU) qui induit la toxicité la plus importante. Cette toxine possède une activité phospholipase à l'origine de la dégradation de la membrane des cellules, conduisant à une apoptose rapide. (Phillips, 2003 ; Sato *et al.*, 2003). ExoY, bien que responsable d'un remodelage du cytosquelette d'actine à l'origine d'un arrondissement des cellules, ne semble pas toxique (Beckert *et al.*, 2014 ; Yahr *et al.*, 1998).

Récemment, une nouvelle toxine injectée par le SST3 a été découverte. Il s'agit de NDK, pour Nucleotide Diphosphate Kinase. Bien que son rôle dans la virulence de la bactérie

n'ait pas été complètement élucidé, il semblerait que la cytotoxicité de NDK soit bien inférieure à celle d'ExoS. Sa particularité est d'être sécrétée par le SST1 alors que son injection est dépendante du SST3 (Neeld *et al.*, 2014)

e. Les chaperones translocatrices

Les chaperones translocatrices facilitent le passage des effecteurs mais aussi des protéines de l'appareil de translocation, à travers le SST3. La chaperone SpcS, ou Orf1, est responsable de la prise en charge d'ExoS et ExoT (Shen *et al.*, 2008) tandis que c'est SpcU qui est responsable de la translocation d'ExoU (Finck-Barbançon *et al.*, 1998). La chaperone d'ExoY est encore inconnue à ce jour. Les protéines PopB et PopD possèdent également une chaperone, en l'occurrence PcrH (Schoehn *et al.*, 2003).

iii. Ingénierie du SST3 pour la vectorisation de protéines d'intérêt

Des travaux préliminaires de l'équipe TheREx ont permis de mettre au point une souche de *P. aeruginosa* utilisable à des fins biotechnologiques. Pour cela, les membres de l'équipe TheREx ont travaillé sur plusieurs paramètres :

- la génération d'une souche atténuée, présentant une cytotoxicité réduite
- le détournement de la machinerie SST3 pour transporter des protéines d'intérêt
- un système global inductible et contrôlable, permettant de faire fonctionner le SST3 à façon

a. Génération d'une souche de *P. aeruginosa* atténuée

Premièrement, une souche atténuée a été générée par génie génétique, en supprimant les gènes codant pour ExoT et ExoS, soit les deux exotoxines les plus toxiques de la souche utilisée, étant donné qu'elle ne produit naturellement pas ExoU. Cette délétion génique a été réalisée par recombinaison homologe grâce à la méthode cre-lox/SacB, également développé au sein de l'équipe (Quénée *et al.*, 2005). Cette délétion a été réalisée sur l'isolat clinique CHA (Toussaint *et al.*, 1993) et a donné naissance à la souche OST (ou CHA-OST, pour Δ exoS et Δ exoT).

b. Génération d'un plasmide d'expression spécifique

En parallèle de la génération d'une souche atténuée, une séquence minimale de translocation a été identifiée au laboratoire, permettant le transport de protéines d'intérêt couplées via le SST3. Cette séquence, ExoS54, est constituée des 54 premiers acides aminés d'ExoS (Figure 15).

Il est important de signaler que'ExoS54 ne contient aucun acide aminé impliqué dans l'activité apoptotique de la toxine (domaines RhoGAP et ADP-Ribosyl transférase). Par ailleurs, il a été montré, qu'une fois injectée dans une cellule mammifère, ExoS était adressée au niveau du réticulum endoplasmique via un transport endosomal, grâce à son domaine MLD (Membrane Localization Domain). Cette séquence est également responsable d'un réadressage de la toxine au niveau de la membrane plasmique (Deng *et al.*, 2007). ExoS54 ne comporte que 3 acides aminés sur les 26 du domaine MLD. Ceci laisse penser que les protéines fusionnées à ExoS54 ne sont pas soumises à un tel adressage une fois injectées via le SST3.

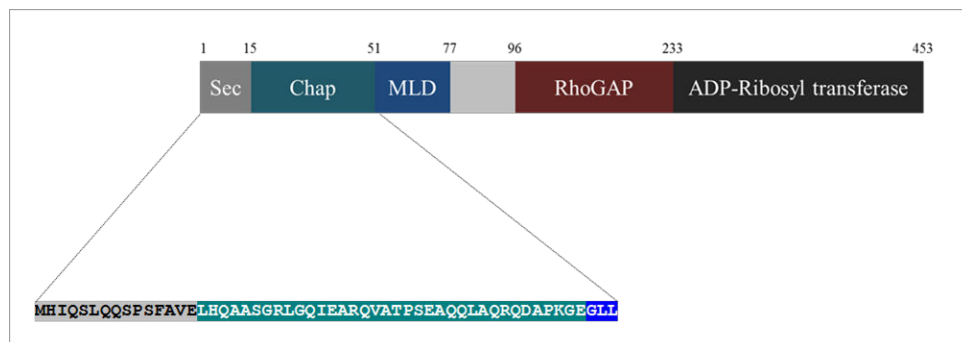


Figure 15. Représentation schématique d'ExoS et séquence peptidique d'ExoS54. La toxine comprend une région N-terminale (Sec) impliquée dans le processus de translocation, un domaine Chap permettant la prise en charge par la chaperone translocatrice SpsS, un domaine MLD d'adressage intracellulaire de la protéine, un domaine RhoGAP et un domaine ADP-Ribosyl transférase situé en position C-terminale. ExoS54 comprend les domaines Sec, Chap, et les trois premiers acides aminés de MLD (Adapté de Deng and Barbieri, 2008).

Un plasmide d'expression a ainsi été mis au point, au sein duquel la séquence nucléotidique codant ExoS54 a été insérée entre le promoteur naturel activé par ExsA et un site de clonage multiple (Figure 16). De plus, ce plasmide, le pEAI3S54 (pEAI), possède la séquence codant pour ExsA, sous la dépendance d'un promoteur *ptac* inductible à l'IPTG.

Grâce à ce plasmide, il est ainsi possible de faire exprimer par la bactérie une protéine d'intérêt fusionnée à ExoS54, qui est ensuite prise en charge par la chaperone d'ExoS, permettant sa translocation dans l'environnement extracellulaire via le SST3. Cette stratégie a été employée la première fois pour l'injection *in vivo* de protéines à visée anti tumorale, dans un modèle de mélanome B16-Ova (Brevet WO2005/049644A2 ; Epaulard *et al.*, 2006).

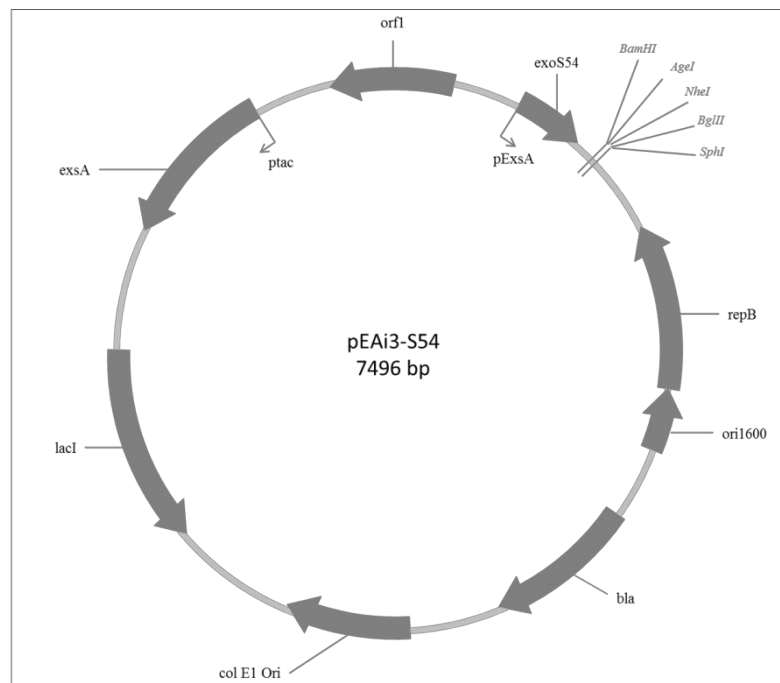


Figure 16. Carte du plasmide pEAI3S54. Eléments principaux : bla, cassette de résistance aux β -lactames ; colE1 ori, origine de répllication chez *E. coli* ; exoS54, 54 premiers acides aminés de l'exotoxine S ; exsA : activateur transcriptionnel des gènes du SST3 ; lacI, Lac répresseur ; ori1600, origine de répllication chez *P. aeruginosa* ; orfI, chaperone translocatrice de l'exotoxine S ; pExsA, promoteur cible naturel d'ExsA ; ptac, promoteur inducible par l'iPTG ; repB, protéine essentielle pour la répllication du plasmide ; Site de clonage multiple, BamHI/AgeI/NheI/BglII/SphI.

c. Contrôle du SST3 et translocation de protéines d'intérêt grâce au plasmide pEAI

Grâce au vecteur précédemment cité, le pEAI, il est possible de contrôler finement l'expression d'une protéine d'intérêt fusionnée à ExoS54, mais aussi l'activation du SST3 (Figure 17). En effet, en plus de comporter la séquence codant pour ExoS54 en amont d'un site de clonage multiple, sous la dépendance du promoteur naturel des éléments du SST3

activé par ExsA, il comporte également la séquence codant pour l'activateur transcriptionnel ExsA, sous la dépendance du promoteur inductible *ptac*. La surexpression d'ExsA via ce promoteur permet de surexprimer les différents éléments génomiques du SST3.

Ainsi, l'ajout d'IPTG permet non seulement d'induire indirectement la production de notre protéine d'intérêt couplée à ExoS54, mais aussi d'induire l'expression de tous les éléments du SST3, grâce à la surexpression d'ExsA. En parallèle, l'induction de la sécrétion des protéines produites est permise par une déplétion en ions Ca^{2+} dans le milieu de culture, ou après contact des bactéries avec des cellules eucaryotes, *in vitro* ou *in vivo*.

Grâce à ce système basé sur l'utilisation du plasmide pEAi, il est ainsi possible de contrôler de manière spatiale et temporelle, l'expression des éléments du SST3 et ainsi de forcer l'accumulation d'injectisomes au niveau de la paroi bactérienne, mais aussi l'expression d'une protéine d'intérêt fusionnée à la séquence minimale de translocation ExoS54. La translocation sera permise dans un second temps, grâce à l'application de conditions favorables à l'activation du SST3.

Ce système a permis de mettre au point différentes applications basées sur l'utilisation de cette bactérie atténuée couplée au plasmide d'expression pEAi. Une majeure partie de ces applications sont l'œuvre de l'équipe TheREx, avec notamment le développement de protocoles de vaccination anti-tumorale ou de production/sécrétion de protéines recombinantes solubles.

Récemment, des équipes américaines ont mis en évidence la possibilité d'utiliser le SST3 de *P. aeruginosa* pour vectoriser des protéines nucléaires dans différents types cellulaires.

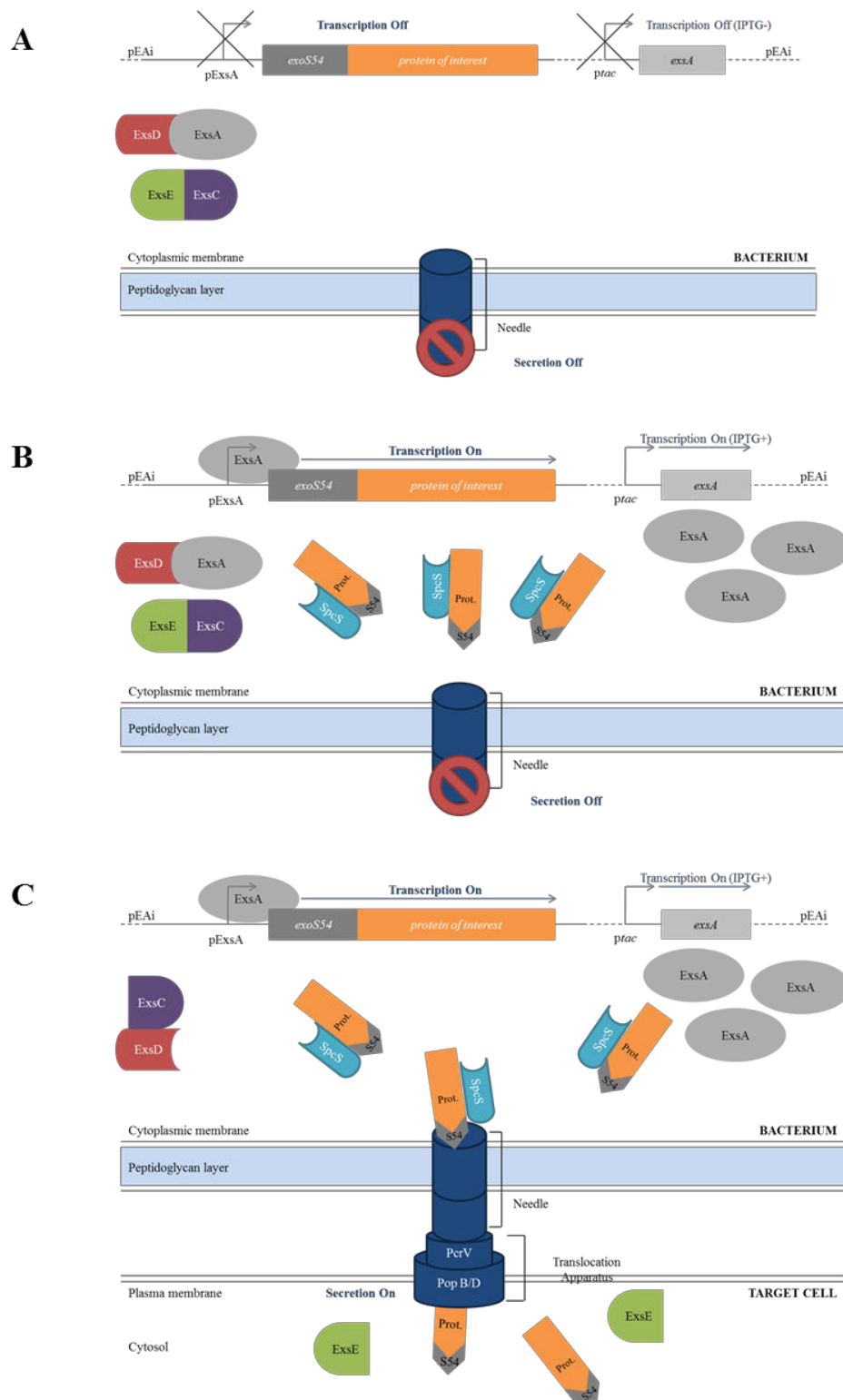


Figure 17. Contrôle du SST3 et translocation de protéines recombinantes via le SST3 de *P. aeruginosa*. (A) SST3 inactif et répression d'ExsA en l'absence d'IPTG. (B) L'ajout d'IPTG induit une surexpression d'ExsA, à l'origine de l'activation de la transcription et de l'expression de la protéine d'intérêt (Prot.) fusionnée à ExoS54 (S54), mais aussi de tous les éléments du SST3 codés par le génome de la bactérie. (C) Dans des conditions favorisant l'activation et l'ouverture du SST3, ici un contact avec une cellule eucaryote, le SST3 est activé et la protéine d'intérêt fusionnée à ExoS54 est transportée jusqu'au cytoplasme de la cellule cible, grâce à l'intervention de la chaperone SpcS.

d. Applications

◆ *Vectorisation de protéines thérapeutiques*

Grâce à l'ingénierie biotechnologique du SST3 de *P. aeruginosa* décrite précédemment, l'équipe TheRex a développé des protocoles d'immunothérapie active du cancer extrêmement prometteurs.

Les auteurs ont utilisé cette bactérie comme vecteur pour induire des réponses T cytotoxiques spécifiques de l'antigène vectorisé, sur différents modèles tumoraux, en prophylaxie comme en mode curatif.

La bactérie, administrée par voie sous-cutanée, est capable d'injecter efficacement dans les cellules présentatrices d'antigènes un peptide antigénique spécifique de la tumeur fusionné à ExoS54 grâce à son SST3. Cette injection intracytosolique se traduit par la présentation des épitopes via le CMH1. Cette stratégie a été employée efficacement sur des modèles murins de mélanome (Epaulard *et al.*, 2006a) et de gliome (Derouazi *et al.*, 2010 ; Wang *et al.*, 2012a), pour lesquels des réponses T CD8+ spécifiques ont été observées.

Ces publications mettent en avant la capacité du SST3 à injecter des protéines d'intérêt actives au sein de cellules cibles, *in vitro* mais aussi *in vivo*.

◆ *Production et sécrétion de protéines recombinantes*

Parmi les applications envisageables du vecteur, il est également possible d'utiliser ses propriétés pour produire des protéines recombinantes solubles. La sécrétion de protéines recombinantes facilite l'obtention de la protéine puisqu'aucune étape de lyse n'est nécessaire. De plus, la sécrétion permet de sortir de l'environnement réducteur du cytoplasme, favorisant le repliement de protéines complexes contenant des ponts disulfures.

Les systèmes bactériens, et notamment *Escherichia coli* (*E. coli*), de par sa facilité d'utilisation, les faibles coûts de culture et de production associés ainsi que la génétique bien connue et modifiable à façon, sont les plus utilisés pour la production de protéines recombinantes. Ces systèmes présentent l'avantage de pouvoir produire de grandes quantités de protéines, mais les protéines sont quelques-fois produites sous forme insoluble

au sein de corps d'inclusion. Ces corps d'inclusion sont la plupart du temps inactifs et très difficiles à solubiliser (Demain and Vaishnav, 2009). La sécrétion de protéines dans le milieu extracellulaire permet quelque fois de favoriser le repliement de ces protéines. La sécrétion de protéines recombinantes est principalement associée aux systèmes d'expression eucaryotes (mammifères ou insectes), qui sont en revanche plus difficiles à utiliser et dont la culture est relativement onéreuse. Néanmoins, ces dernières années, des systèmes de sécrétion procaryote ont vu le jour (Zhang *et al.*, 2010) ou de levure (Kottmeier *et al.*, 2011), ouvrant la voie à un nouveau mode de production de protéines solubles.

Le SST3 de *P. aeruginosa* a ainsi été employé par l'équipe TheREx pour la production et la sécrétion de protéines recombinantes. Pour cette application, une nouvelle souche a été développée à partir d'OST. La souche OST-BD (pour Δ popB, Δ popD) ne possède pas les deux protéines structurales PopB et PopD constituant l'appareil de translocation.

En plus d'atténuer considérablement la virulence de la bactérie puisqu'elle est incapable d'injecter les toxines dans les cellules, ceci réduit également la quantité de protéines de la bactérie présentes dans le surnageant de culture. La protéine sécrétée se retrouve ainsi dans un environnement très peu contaminée par les autres protéines bactériennes, très proche de ce que qui est quelques-fois observé après une première étape de purification d'une protéine produite dans le cytoplasme de la bactérie. Des protéines complexes telles Gp100, protéine de taille importante contenant des ponts disulfures ont pu être sécrétées sous forme soluble via le SST3, avec des rendements intéressants.

Cette propriété de pouvoir transporter des protéines avec des structures complexes font du SST3 un vecteur tout à fait pertinent dans l'optique de vectoriser des facteurs de transcription embryonnaires, leur conformation étant essentielle à leur fonction.

◆ *Transport et injection de protéines nucléaires actives*

Plusieurs équipes de recherche ont récemment mis en évidence la capacité du SST3 à injecter des protéines nucléaires actives au sein de différents types cellulaires.

Le SST3 est notamment capable d'injecter des nucléases. Au cours d'une première expérience, les propriétés du SST3 d'une souche PAK et d'ExoS54 ont été employées afin d'injecter la Cre recombinase au sein d'iPS murines générées grâce à un vecteur intégratif

excisable, portant les séquences des transgènes flanquées par des séquences de recombinaison homologue *loxP* (Bichsel *et al.*, 2011). La Cre recombinase injectée par le SST3, est capable d'exciser les éléments exogènes intégrés dans le génome des cellules, avec une efficacité de recombinaison avoisinant les 30%. De la même manière, l'équipe de Jia a mis en évidence l'injection d'une nucléase de type TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) au sein de la lignée de cellules épithéliales humaines HELA. L'utilisation d'un gène rapporteur cible a permis d'estimer l'efficacité d'excision à 10% après une seule injection (Jia *et al.*, 2014).

D'autre part, il est également possible, grâce au SST3, de réaliser la conversion d'un type cellulaire en un autre. En 2013, Bichsel et ses collaborateurs ont réussi à réaliser une transdifférenciation de fibroblastes murins grâce à l'injection du facteur de transcription MyoD, par la même souche PAK-STY, et ce à l'issue d'une seule injection (Bichsel *et al.*, 2013). Ce résultat est très important puisqu'il démontre la possibilité de convertir un type cellulaire en un autre, grâce à la translocation d'un facteur de transcription via le SST3 de *P. aeruginosa*.

Ces données démontrent qu'ExoS54 ne semble pas perturber l'adressage nucléaire des protéines injectées, ni leur activité, au sein de cellules murines et humaines. De plus, le SST3 permet de réaliser la transdifférenciation de cellules mammifères grâce à la translocation d'un facteur de transcription. La reprogrammation cellulaire en iPS étant, comme la transdifférenciation, une conversion d'un type cellulaire en un autre, ceci laisse penser que ce vecteur pourrait se positionner comme une nouvelle stratégie de génération d'iPS. En résumé, ces différentes applications du SST3 appuient la pertinence de l'utilisation du SST3 de *P. aeruginosa* pour vectoriser des facteurs de transcription embryonnaires dans l'optique de générer des iPS humaines sans transfert de matériel génétique.

e. Atténuation de la virulence de la bactérie par traitement photochimique

Afin de limiter la toxicité associée à ce type de vecteur et de proposer un protocole encore plus sécurisé, notamment pour des applications en immunothérapie anti tumorale, l'équipe TheREx a développé une méthode d'atténuation photochimique d'une souche de la bactérie possédant un système de réparation de l'ADN déficient vis-à-vis des dommages causés par les UV. Ce traitement permet de réduire considérablement la dissémination de la bactérie,

qui conserve néanmoins une activité de sécrétion via le SST3 (Figure 18) (Le Gouëllec *et al.*, 2013).

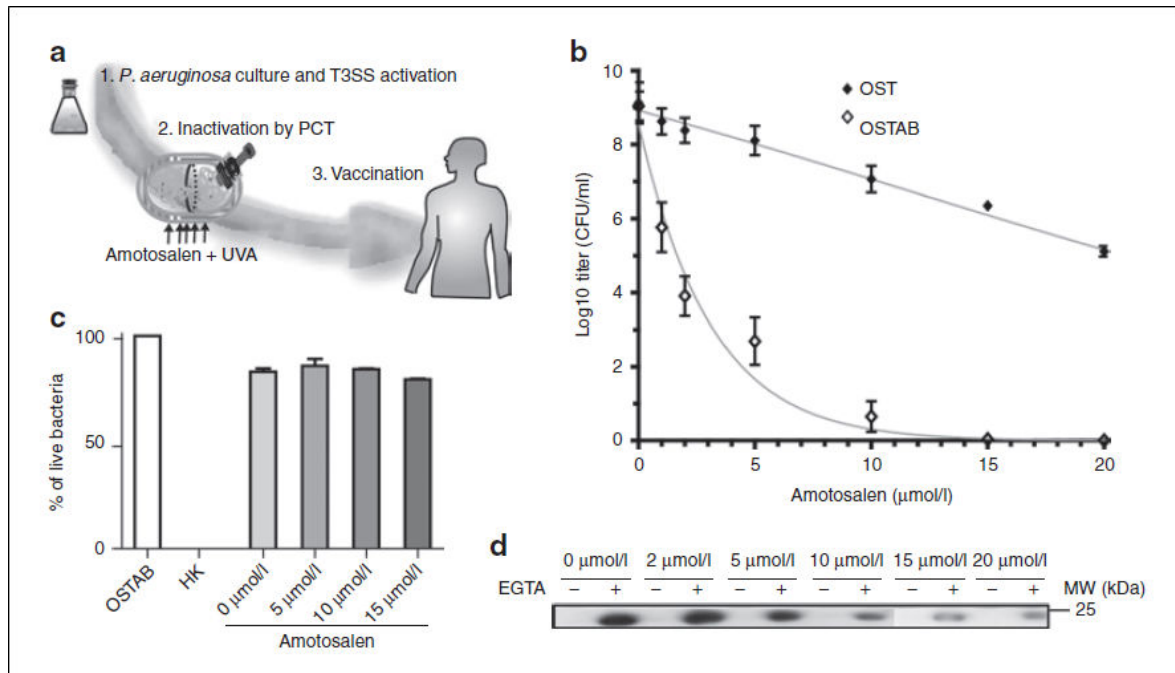


Figure 18. Principe et efficacité du traitement photochimique atténuateur KBMA (Le Gouëllec *et al.*, 2013). (a) Principe général : les bactéries sont cultivées dans des conditions permettant l'expression de la protéine d'intérêt et en présence de l'agent intercalant amotosalène. Après une irradiation aux UVA à 365 nm, les bactéries sont injectées par voie sous-cutanée. (b) Atténuation de la croissance bactérienne par le traitement photochimique : après traitement, les bactéries sont étalées sur une gélose de milieu PIA puis les colonies sont comptées à 24h afin de déterminer le nombre d'unités formant colonie (CFU). (c) Influence de la concentration en amotosalène sur la viabilité de la bactérie après irradiations par les UVA (HK, Heat-Killed : inactivation à la chaleur). (d) Influence de la concentration en amotosalène sur l'efficacité de sécrétion du SST3 : la sécrétion de la protéine d'intérêt fusionnée à ExoS54 est induite dans le surnageant de culture après traitement photochimique. Les protéines du surnageant sont précipitées et puis analysées par SDS-Page suivie d'un immunomarquage pour identifier la protéine d'intérêt.

Ce traitement, KBMA pour "Killed But Metabolically Active" (Mortes mais métaboliquement actives), repose sur l'incorporation d'un agent intercalant, l'amotosalène, au cours de la croissance bactérienne. Sous une irradiation aux UV lointains, cette molécule crée des pontages inter brins de l'ADN (Brockstedt *et al.*, 2005). La souche utilisée, a été génétiquement modifiée à partir de la souche OST par la méthode Cre-lox/SacB évoquée précédemment (Quénée *et al.*, 2005) et ne possède plus les gènes *uvrA* et *uvrB*, codant pour deux enzymes du système ABC de réparation des dommages de l'ADN par excision de nucléotides. A l'issue de ce traitement photochimique, cette souche

OST-AB (pour OST- Δ uvrA, Δ uvrB), conserve un SST3 actif mais sa prolifération est très limitée.

L'équipe TheREx s'est dans un premier temps attachée à déterminer une concentration optimale en agent intercalant, permettant d'atteindre le meilleur compromis possible entre viabilité de la bactérie, réduction de la prolifération et efficacité de translocation. La concentration d'amotosalène retenue est de 10 μ M. Dans ces conditions, la réplication bactérienne est atténuée d'un facteur 10^6 mais les bactéries conservent une activité de translocation via le SST3 relativement importante.

Grâce à ce protocole, les auteurs ont montré, sur le même murin tumoral B16-Ova, la capacité du SST3 de la bactérie atténuée injectée *in vivo* à présenter efficacement un antigène spécifique de la tumeur et à induire réponse T CD8⁺ spécifique de l'antigène tumoral.

Cette stratégie d'atténuation, permettant de conserver un SST3 partiellement actif tout en limitant fortement la dissémination de la bactérie, constitue un atout non négligeable dans l'optique de proposer un protocole de reprogrammation sécurisé avec ce type de vecteur, d'origine bactérienne.

Toutes ces données démontrent que le SST3 de *P. aeruginosa* est un vecteur tout à fait adapté pour la génération d'iPS, de par sa capacité à injecter efficacement des protéines actives au sein de différents types cellulaires. De plus, un protocole de transdifférenciation a récemment été accompli avec succès grâce au SST3 portée par une souche de *P. aeruginosa*, laissant entrevoir la capacité de ce vecteur à être utilisé pour générer des iPS. Par ailleurs, l'équipe TheREx a développé des méthodes d'atténuation apportant un niveau de sécurité intéressant au vecteur. A ce jour, aucun protocole de génération d'iPS par ce type de vecteur n'a été utilisé pour générer des iPS, ce qui constitue un véritable challenge dans l'optique de faire progresser les méthodes de reprogrammation cellulaire par transfert de protéines.

III. Cellules à reprogrammer

Les applications finales des cellules générées à partir des iPS obtenues par reprogrammation sont en partie dictées par le type cellulaire des cellules initiales. Le choix du type cellulaire à reprogrammer est donc primordial.

Comme indiqué précédemment, ce projet de recherche s'inscrit dans un projet global collaboratif visant à générer des iPS sécurisées potentiellement utilisables en clinique, qui seront différenciées en cellules hématopoïétiques pour des applications en médecine régénérative et en transfusion. Les iPS seront générées par l'équipe TheRex à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH) de sang de cordon et de fibroblastes, et seront utilisées pour : (i) générer des globules rouges pour des applications en transfusion, permettant de suppléer aux poches utilisées actuellement ; (ii) générer des cellules souches hématopoïétiques (CSH) pour le traitement des hémopathies malignes telles que la leucémie aigüe myéloïde ou l'aplasie médullaire idiopathique (Figure 19).

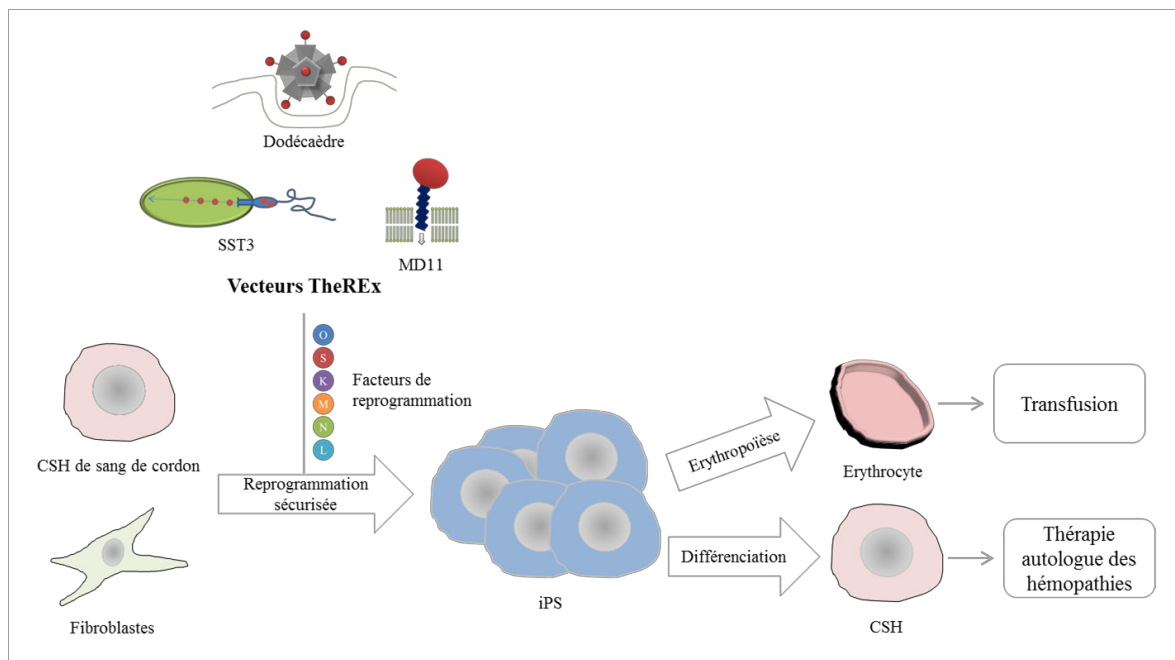


Figure 19. Aperçu général du projet collaboratif TIMC-TheREx/EFS de génération d'iPS par une reprogrammation protéique innovante et différenciation en CSH et érythrocytes pour des applications en hématologie.

1. Cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon

i. Caractéristiques et obtention

Les CSH sont des cellules immatures du système sanguin, multipotentes, capables de donner naissance à tous les types de cellules sanguines (Figure 20).

Elles sont présentes principalement au niveau de la moelle osseuse mais aussi à moindre mesure dans le sang périphérique et permettent un renouvellement constant des constituants cellulaires du système sanguin. Elles sont également présentes en quantité importante dans le sang de cordon ombilical ou sang placentaire (Broxmeyer *et al.*, 1990 ; Suda *et al.*, 2005).

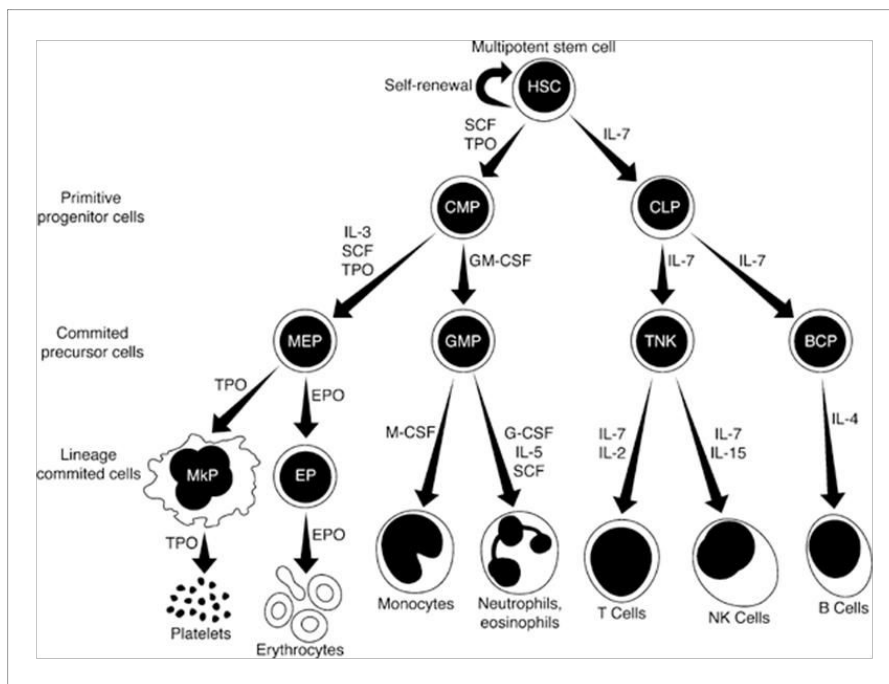


Figure 20. Schéma simplifié de l'hématopoïèse (Robb, 2007). La cellule souche hématopoïétique (HSC) se différencie dans un premier temps en deux types de progéniteurs : le progéniteur myéloïde commun (CMP) et le progéniteur lymphoïde commun (CLP). Le CMP se différencie par la suite en précurseurs myéloïdes des mégacaryocytes et cellules érythroïdes (MEP) et précurseurs des granulocytes et macrophages (GMP). Les MEP donnent naissance aux mégacaryocytes (MkP) et aux progéniteurs érythroïdes (EP) générant les plaquettes et les érythrocytes, respectivement. Le GMP donne naissance aux monocytes et aux cellules polynucléaires. Le CLP se différencie en précurseurs des cellules T et Natural Killer (NK) (TNK) et en précurseurs des cellules B (BCP). Alors que le précurseur TNK se différencie en lymphocyte T et en NK, le BCP se différencie en lymphocytes B. Les principales cytokines impliquées dans chaque étape de différenciation sont indiquées à côté des flèches.

La greffe de CSH permet de traiter des patients atteints de maladies génétiques du sang telles que les aplasies médullaires ou les thalassémies sévères mais aussi les hémopathies malignes telles que les leucémies aiguës et chroniques ou encore les lymphomes. La greffe de CSH constitue la seule thérapie cellulaire allogénique validée en France à ce jour. Parmi les patients nécessitant une greffe de CSH, 30% ne trouvent pas de donneur compatible parmi les unités de moelle osseuse ou de sang périphérique. Grâce aux banques de sang de cordon, 30 à 60% de ces patients trouvent un greffon compatible.

Depuis 1999 et la création d'un réseau de stockage de sang de cordon, l'Etablissement Français du Sang (EFS) dispose d'un savoir-faire unique dans le prélèvement, la préparation et la conservation d'unités de sang placentaire. En 2007, plus de 6000 greffons de sang de cordon sont stockés en France au sein des banques de l'EFS. En 2008, les greffes de CSH de sang de cordon représentent quasiment 30% des greffes non apparentées.

Le sang est prélevé juste après l'accouchement avec le consentement écrit de la mère. Des analyses sérologiques et microbiologiques sont réalisées sur le sang placentaire et sur le sang maternel. Les typages HLA sont également déterminés pour toutes les unités de sang. L'utilisation est soumise à un cadre réglementaire très strict, avec un ensemble de bonnes pratiques de thérapie cellulaire à suivre. Les unités de sang de cordon pour lesquelles le volume est inférieur à 70 ml et/ou la quantité de cellules souches, identifiées par la présence du marqueur CD34, est inférieure à 2.10^6 ne peuvent pas être conservées pour la thérapie et peuvent donc être utilisées en recherche (sources : dossiers de presse de l'EFS et de l'Agence de la Biomédecine).

ii. Intérêts de la reprogrammation à partir de CSH de sang de cordon

Une des finalités du projet sur le long terme est d'utiliser les iPS générées de manière sécurisée grâce à nos vecteurs afin de produire des globules rouges thérapeutiques *in vitro*.

Chaque année, ce sont presque 85 millions de transfusion de globules rouges qui sont réalisées à travers le monde (Carson *et al.*, Clinical Transfusion Medicine Committee of the AABB, 2012), avec des problèmes récurrents de disponibilité, en particulier pour les groupes sanguins rares. C'est pourquoi trouver une alternative sûre et durable aux transfusions est un challenge majeur.

Une des solutions les plus évidentes serait d'amplifier *in vitro* les banques de CSH disponibles. Malheureusement, l'amplification *ex vivo* de CSH demeure encore à ce jour un défi. En effet, l'auto-renouveau des CSH *in vivo* implique une signalisation croisée extrêmement complexe entre facteurs de transcription, protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire mais aussi microenvironnement local. Cette niche hématopoïétique extrêmement complexe est difficile à reproduire *in vitro*. Les protocoles proposés à ce jour conduisent la plupart du temps à une différenciation des CSH en progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes, limitant ainsi le potentiel hématopoïétique du greffon (Aggarwal *et al.*, 2012 ; Ivanovic and Boiron, 2009 ; Takizawa *et al.*, 2011).

Récemment, l'équipe du Professeur Luc Douay a réalisé la prouesse de générer des globules rouges à partir d'iPS humaines. Pour cela, les auteurs ont réalisé une induction précoce de l'érythropoïèse à partir d'iPS humaines générées à partir de fibroblastes grâce à un vecteur lentiviral, ne passant pas par le stade CSH (Lapillonne *et al.*, 2010). Les globules rouges obtenus sont parfaitement fonctionnels et produisent de l'hémoglobine fœtale. De plus, lors d'un essai clinique, les auteurs ont démontré que des globules rouges générés *in vitro* possédaient une demi-vie comparable à celle des globules rouges naturels. (Giarratana *et al.*, 2011).

Cette différenciation directe d'iPS constitue une avancée majeure dans la perspective de trouver une alternative pérenne à l'utilisation de poches de moelle osseuse et de sang périphérique.

Comme indiqué précédemment, l'un des avantages des CSH de sang de cordon est leur disponibilité au sein de banques avec les typages HLA et de groupes sanguins établis et les analyses sérologiques réalisées. D'autre part, elles constituent l'un des matériaux biologiques les plus sûrs car très peu exposées aux agents mutagènes, elles présentent un risque d'altération génétique faible. De plus, leur patrimoine épigénétique les oriente naturellement vers l'hématopoïèse.

Enfin, il est important de noter que des iPS ont déjà été générées à partir de CSH de sang de cordon grâce à l'utilisation de vecteurs intégratifs (Takenaka *et al.*, 2010) mais aussi grâce à des vecteurs non intégratifs, en l'occurrence des plasmides (Meng *et al.*, 2012 ; Okita *et al.*, 2013).

Toutes ces caractéristiques, associées à l'accessibilité de ces cellules via les banques de l'EFS, en font un matériau de choix dans notre objectif de générer des iPS de manière sécurisée, qui subiront par la suite une différenciation érythroïde à des fins thérapeutiques.

2. Fibroblastes

i. Caractéristiques et obtention

Les fibroblastes sont des cellules appartenant au tissu conjonctif et sont issus de la différenciation d'une cellule souche multipotente mésenchymateuse. Ils synthétisent des constituants majeurs de la matrice extracellulaire, tels que le collagène, l'élastine ainsi que les glycosaminoglycanes.

Bien que ces cellules ne soient pas les plus faciles à reprogrammer, elles sont pourtant utilisées dans 80% des essais de reprogrammation. Dans la bibliographie, elles sont utilisées comme cellules de référence dans les études de génération d'iPS avec les différents types de vecteurs existants (González *et al.*, 2011). Elles sont historiquement les premières à avoir été utilisées pour la génération d'iPS murines et humaines (Takahashi and Yamanaka, 2006 ; Takahashi *et al.*, 2007) et le processus de reprogrammation associé est donc le plus étudié à ce jour.

D'autre part, dans la perspective d'envisager des thérapies autologues régénératives, elles peuvent être facilement prélevées chez le patient grâce à une biopsie de peau, soit une technique relativement peu invasive.

Enfin, de nombreuses lignées de ce type cellulaire sont disponibles avec des conditions de culture bien connues, permettant de mettre au point les méthodes avant d'utiliser des cellules de patient qui sont un matériau relativement rare et précieux.

Toutes ces caractéristiques et tous les travaux réalisés à ce jour font du fibroblaste la cellule de référence pour les études et le développement de technologies impliquant les iPS.

ii. Intérêts de la reprogrammation à partir de fibroblastes

L'autre versant de l'objectif final du projet est de proposer une source d'iPS sûre à des fins de thérapie autologue.

Les iPS générées de manière sécurisée seront différenciées en CSH pour proposer des traitements dans le domaine de l'hématologie. La thérapie autologue permet de limiter considérablement les risques de développement d'une réaction du greffon contre l'hôte ou de rejet, étant donné que les patrimoines génétiques du greffon et de l'hôte sont identiques.

Le traitement des hémopathies malignes et pathologies sanguines génétiques repose sur des chimiothérapies et radiothérapies associées à des greffes de CSH afin de reconstituer une hématopoïèse saine. Bien que les banques de sang de cordons puissent palier à certains des besoins, la disponibilité de greffons compatibles reste un problème majeur. Comme nous l'avons abordé précédemment il est à l'heure actuelle difficile de réaliser une expansion *in vivo* des CSH sans perdre le potentiel du greffon.

C'est pourquoi la génération *in vitro* de CSH à partir d'iPS, provenant de cellules issues de tissus extra hématopoïétique, serait une méthode de choix afin de proposer une alternative aux sources actuelles de CSH. De par leurs propriétés, les fibroblastes constituent un matériel biologique intéressant, puisque non hématopoïétiques, facilement accessibles et faisant référence dans les études de reprogrammation.

Des travaux récents ont d'ailleurs mis en avant la possibilité de générer des cellules myéloïdes et lymphoïdes à partir d'iPS (Lachmann *et al.*, 2015 ; Loh *et al.*, 2009), mais aussi de CSH humaines via la formation de tératomes (Suzuki *et al.*, 2013), soulignant ainsi la faisabilité et la pertinence du projet.

IV. Démarche scientifique

L'objectif primaire du projet est de proposer une nouvelle stratégie non intégrative innovante de génération d'iPS.

Dans un premier temps, les vecteurs innovants de l'équipe TheRex seront produits avec les différents facteurs de transcription associés. Ceci permettra d'apprécier les facilités de

production de chacun d'entre eux, mais aussi d'évaluer l'influence des différentes séquences de vectorisation associées à chaque vecteur, à savoir ExoS54, MD11 et WW3, sur la fonction des facteurs de transcription. En parallèle, grâce à l'utilisation de systèmes rapporteurs, l'efficacité de vectorisation au sein des différents types cellulaires d'intérêt sera évaluée pour chacun d'entre eux. Cette première partie permettra de valider l'un des vecteurs en fonction de ces différents critères.

Le vecteur sélectionné, sera par la suite développé et optimisé. Un travail considérable sera réalisé sur l'amélioration de ses conditions d'utilisation afin de permettre une vectorisation efficace de facteurs de transcription actifs, en travaillant également sur l'aspect toxicité. La combinaison optimale de facteurs de reprogrammation, permettant une activation transcriptionnelle maximale du réseau de pluripotence, sera également déterminée. Enfin, des ajustements seront réalisés dans l'optique de proposer un protocole de reprogrammation à long terme de CSH de sang de cordon et de fibroblastes, dans l'optique de générer des iPS de manière sécurisée et efficace.

Pour résumer, nous proposons de développer une technologie innovante pour la génération d'iPS par transfert de protéines. Les techniques actuelles, relativement peu efficaces et difficiles à mettre en œuvre, reposent pour la plupart sur l'utilisation de CPP. Les vecteurs qui seront employés sont inédits dans ce domaine puisque nous utiliserons une micro-seringue bactérienne, une particule pseudo-virale ainsi qu'un CPP de nouvelle génération. L'efficacité de ces vecteurs pour transporter des biomolécules actives a été mise en avant à plusieurs reprises, notamment dans des protocoles d'immunothérapie du cancer ou de vaccination. Les iPS seront dérivées de fibroblastes et de CSH de sang de cordon et pourront être utilisées en médecine régénérative, avec notamment de nombreuses applications dans le domaine de l'hématologie. Alors que les fibroblastes sont les cellules de référence dans les études de génération d'iPS, les CSH de sang de cordon constituent l'une des sources de cellules les plus sûres.

MATERIELS ET METHODES

I. Plasmides et souches

1. Génération des plasmides recombinants

i. Obtention des séquences codantes d'intérêt

Les ADN complémentaires (ADNc) codant pour les différentes séquences d'intérêt ont été obtenus soit par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) soit par synthèse de gènes. Les PCR sont réalisées à l'aide de la polymérase PFU Ultra (Agilent Technologies), selon le protocole du fournisseur. La liste des amorces utilisées et de leurs caractéristiques est présentée dans le Tableau 12. Les gènes synthétiques sont fournis par la société GeneCust (Luxembourg).

Tableau 12. Liste des amorces utilisées pour les réactions de PCR. Les séquences complémentaires aux ADNc cibles sont en lettres majuscules, les sites de restriction sont soulignés.

Nom	Séquence (5'-3')	Sites de restriction	Vecteur d'intégration
Tev-Ova-Forward	cggatccgaaaacctgtatttcagggc <u>accggt</u> GATGAAGTCTCAGG CCTTG	BamHI, AgeI	pEAi
H₆-Ova-Reverse	gggcatgcttagtgatgatgatgatgatgcatatgGGCGTTGGTTGCGA TGT	NdeI, SphI	pEAi
Bla-Forward	gccatagCCAGAAACGCTGGTGAAGTAA	NdeI	pET15b
Bla-Reverse	gcggatccCCAATGCTTAATCAGTGAGGCAC	BamHI	pET15b
Oct4-Forward	caggatccGCGGGACACCTGGCTTC	BamHI	pEAi
Oct4-Reverse	cacatagGTTTGAATGCATGGGAGAGC	NdeI	pEAi
Sox2-Forward	caggatccTACAACATGATGGAGACGGAGC	BamHI	pEAi
Sox2-Reverse	cacatagCATGTGTGAGAGGGGCAGTG	NdeI	pEAi
Oct4-Forward	gagcatatgGCGGGACACCTGGCTTC	NdeI	pET15b
Oct4-Reverse	ctcggatccGTTTGAATGCATGGGAGAGC	BamHI	pET15b
Sox2-Forward	gagcatatgTACAACATGATGGAGACGGAGC	NdeI	pET15b
Sox2-Reverse	ctcggatccCATGTGTGAGAGGGGCAGTG	BamHI	pET15b
Oct4-Forward	gaggcgccgcGCGGGACACCTGGCTTC	NotI	pET15b-MD11&WW3
Oct4-Reverse	gaggctagcGTTTGAATGCATGGGAGAGC	NheI	pET15b-MD11&WW3
Sox2-	gaggcgccgcTACAACATGATGGAGACGGAGC	NotI	pET15b-

Forward			MD11&WW3
Sox2-Reverse	<u>gaggctagc</u> CATGTGTGAGAGGGGCAGTG	BamHI	pET15b-MD11&WW3

La liste des séquences nucléotidiques codant pour les différentes protéines d'intérêt, ainsi que les tailles et masses moléculaires des protéines codées, est présentée dans le Tableau 13.

Tableau 13. Références et caractéristiques des différentes séquences nucléotidiques et protéines d'intérêt.

Gène	Numéro HGNC	ADNc (N°CCDS)	Taille (en nt)	Protéine correspondante	Numéro Uniprot	Masse (en kDa)
<i>bla</i>	-	-	789	Beta-lactamase TEM (Bla), P ₂₄ -W ₂₈₆	P62593	28,8
<i>bzlf1</i>	-	-	141	Trans-activator protein BZLF1 (EB1) (Zebra), K ₁₇₈ -Q ₂₂₀ (MD11)	P03206	5,7
<i>exoS</i>	-	-	162	Exoenzyme S, M ₁ -L ₅₄ (ExoS54)	Q51451	5,8
<i>klf4</i>	6348	6770.2	1440	Kruppel-like factor 4 (Klf4), isoforme 2	O43474-1	50,1
<i>lin28a</i>	15986	280.1	630	LIN-28 Homolog A (Lin28a)	Q9H9Z2	22,6
<i>myc</i>	7553	6359.2	1320	Myc proto-oncogene protein (c-Myc), isoforme 1	P01106-1	48,7
<i>nanog</i>	20857	31736.1	918	Homeobox protein NANOG (Nanog), isoforme 1	Q9H9S0-1	34,5
<i>nedd4</i>	7727	10156.1	99	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4, domaine WW3 (F ₈₀ -L ₁₁₂)	P46934	4,0
<i>pou5f1</i>	9221	34391.1	1083	POU domain, class 5, transcription factor 1 (Oct-4), isoforme A	Q01860-1	38,4
<i>serpinb14</i>	-	-	390	Chicken Ovalbumin (Ova), D ₂₄₈ -A ₃₇₆	P01012	14,1
<i>sox2</i>	11195	3239.1	954	Transcription factor SOX-2 (Sox-2)	P48431	34,2

ii. Clonage

Les plasmides et produits PCR sont digérés pendant 10 minutes à 37°C grâce aux enzymes de restriction de New England BioLabs (NEB). Après extraction sur gel des produits de digestion (Kit "PCR clean-up, gel extraction", Macherey-Nagel), une ligation est réalisée à partir de 50 ng de vecteur avec un ratio moléculaire vecteur : insert 1:3, grâce au kit

"Rapid DNA Ligation Kit" (Roche Applied Science). Le produit de ligation est ensuite ajouté aux bactéries chimio-compétentes DH5α (Life Technologies) à un ratio plasmide : bactéries 2,5 µl : 25 µl. La transformation est réalisée par choc thermique pendant 45 secondes à 42°C. Deux-cent microlitres de milieu S.O.C (Life Technologies) sont ajoutés aux bactéries transformées et le mélange est incubé pendant 1h à 37°C à 250 rpm, puis étalé sur boîte LB-agar avec de l'ampicilline à 100 µg/ml. Tous les plasmides générés sont vérifiés par séquençage, réalisé par la société LGC Genomics (Allemagne).

iii. Extraction et purification des plasmides

Des colonies issues de la transformation de bactéries compétentes DH5α par les différents produits de ligation sont ensemencées sur la nuit à 37°C dans 2 ml de milieu LB complémenté en ampicilline à 100 µg/ml. Le lendemain, la culture est centrifugée pendant 5 min à 8000 g. Après élimination du milieu de culture, les bactéries sont lysées et les plasmides purifiés grâce au kit "NucleoSpin® Plasmid" (Macherey-Nagel). La liste des plasmides utilisés et générés au cours de ce travail est présentée dans le Tableau 14.

Tableau 14. Liste des plasmides utilisés au cours du projet.

Plasmide (abréviation)	Description	Source
pcDNA3.3_OCT4	Séquence de l'ADNc codant Oct4 insérée au sein du plasmide commercial pcDNA3.3 TOPO TA (Invitrogen)	Plasmide Addgene #26816
pcDNA3.3_SOX2	Séquence de l'ADNc codant Sox2 insérée au sein du plasmide commercial pcDNA3.3 TOPO TA (Invitrogen)	Plasmide Addgene #26817
pEAI3S54 (pEAI)	Séquence codant les 54 premiers acides aminés de l'Exotoxine S (ExoS54) en amont du site de clonage multiple	(Epaulard <i>et al.</i> , 2006a)
pEAI3S54-Ova	Code la partie C-terminale (D ₂₄₈ -A ₃₇₆) de l'ovalbumine de poulet, fusionnée à ExoS54	Ce travail
pEAI-Bla	Code la Bêta-lactamase de type TEM-1 fusionnée à ExoS54	Ce travail
pEAI-Oct4	Code Oct4 fusionné à ExoS54	Ce travail
pEAI-Sox2	Code Sox2 fusionné à ExoS54	Ce travail
pEAI-Nanog	Code Nanog, fusionné à ExoS54	Ce travail
pEAI-Lin28a	Code Lin28a, fusionné à ExoS54	Ce travail
pEAI-cMyc	Code c-Myc, fusionné à ExoS54	Ce travail
pEAI-Klf4	Code Klf4, fusionné à ExoS54	Ce travail
pET15b	Plasmide commercial pour l'expression en <i>E.coli</i>	Merck-Millipore
pET15b-Bla	Code la Bêta-lactamase de type TEM-1	Ce travail
pET15b-Oct4	Code Oct4	Ce travail
pET15b-Sox2	Code Sox2	Ce travail
pET15b-MD11-Bla	Code la Bêta-lactamase de type TEM-1 fusionnée à MD11	Ce travail
pET15b-MD11-Oct4	Code Oct4 fusionné à MD11	Ce travail

pET15b-MD11-Sox2	Code Sox2 fusionné à MD11	Ce travail
pET15b-WW3-Bla	Code la Bêta-lactamase de type TEM-1 fusionnée au domaine WW3	Ce travail
pET15b-WW3-GFP	Code la GFP (Green Fluorescent Protein) fusionnée au domaine WW3	Ce travail
pET15b-WW3-Oct4	Code Oct4 fusionné au domaine WW3	Ce travail
pET15b-WW3-Sox2	Code Sox2 fusionné au domaine WW3	Ce travail
pUC57-MD11-BLA	Gène synthétique comportant la séquence de Bla fusionnée à MD11	Ce travail
pUC57-WW3-BLA	Gène synthétique comportant la séquence de Bla fusionnée à WW3	Ce travail
pUC57-Nanog	Gène synthétique comportant la séquence codant Nanog	Ce travail
pUC57-Lin28a	Gène synthétique comportant la séquence codant Lin28a	Ce travail
pUC57-Myc	Gène synthétique comportant la séquence codant c-Myc	Ce travail
pUC57-Klf4	Gène synthétique comportant la séquence codant Klf4	Ce travail

2. Génération des souches de *P. aeruginosa*

i. Transformation par électroporation

Les souches de *P. aeruginosa* à transformer sont cultivées sur la nuit dans 2 ml de milieu LB. Le lendemain, les bactéries sont lavées deux fois avec du saccharose à 300 mM à 4°C. Pour cela, les bactéries sont centrifugées 2 minutes à 6708 g puis le surnageant est éliminé et les cellules sont reprises dans 500 µl de saccharose. Cette opération est répétée une deuxième fois, 100 ng de plasmide pEAI codant la protéine d'intérêt sont ensuite ajoutés à 100 µl de bactéries, puis le mélange est incubé sur glace pendant 30 minutes. Un choc électrique de 5 ms à 1800 volts est appliqué puis 400 µl de milieu S.O.C. à 37°C sont immédiatement ajoutés. Les bactéries transformées sont incubées pendant 1h à 37°C à 300 rpm et 50 µl sont étalés sur une boîte de gélose PIA ("Pseudomonas Isolation Agar", Becton Dickinson) contenant de la carbénicilline à 600 µg/ml. La liste des souches de *P. aeruginosa* utilisées lors des différentes expériences est présentée dans le Tableau 15.

Tableau 15. Liste des souches de *P. aeruginosa* utilisées

Souche (abréviation)	Description	Source
CHA	Isolat clinique, CHU de Grenoble	(Toussaint <i>et al.</i> , 1993)
CHA-ΔOST (OST)	Délétion de <i>exoS</i> et <i>exoT</i>	(Quénée <i>et al.</i> , 2005)
OST-ΔUvrAB (OST-AB)	Délétion de <i>uvrA</i> et <i>uvrB</i>	(Le Gouëllec <i>et al.</i> , 2013)
OST-ΔPopBΔPopD (OST-BD)	Délétion de <i>popB</i> et <i>popD</i>	(Le Gouëllec <i>et al.</i> , 2013)

ii. Sélection et amplification

Plusieurs colonies issues de l'électroporation sont utilisées pour réaliser un test de sécrétion (décrit ci-dessous). Cent microlitres de la culture sont étalés sur une boîte de PIA-carbénicilline 600 µg/ml. Le tapis bactérien obtenu, mélangé à un cryoprotecteur (Cryosystème Protect, Technical Service Consultants Ltd), est utilisé pour générer un stock qui sera conservé à -80°C.

3. Génération des souches d'expression d'*E. Coli*

Les souches d'expression sont obtenues après transformation de bactéries compétentes, BL21 DE3 pLysS et Rosetta pLysS (Merck-Millipore) par des plasmides recombinants par choc thermique. Rosetta pLysS apporte les codons rares pour l'expression de protéines eucaryotes. Le choc thermique est réalisé à 42°C pendant 30 secondes. Des colonies isolées sont obtenues par étalement sur boîte LB-Agar complémentée en antibiotiques : ampicilline 50 µg/ml et chloramphénicol 30 µg/ml. Les souches sont vérifiées par réalisation d'un test d'expression (voir ci-dessous). Les souches générées sont conservées à -80°C dans un mélange LB 80%, glycérol 20%.

II. Expression, purification et caractérisation des protéines recombinantes

1. Production et sécrétion de protéines recombinantes par *P. aeruginosa*

i. Sécrétion de protéines recombinantes via le SST3 de *P. aeruginosa*

La veille, la souche de *P. aeruginosa* portant le plasmide pEAI codant la protéine d'intérêt est inoculée sur la nuit dans 2 ml de milieu LB avec de la carbénicilline à 300 µg/ml. Le lendemain, la souche est lavée par 1 ml de milieu de sécrétion après une centrifugation de 3 minutes à 6 708 g permettant d'éliminer le milieu de culture. Le milieu de sécrétion est constitué de milieu LB complémenté en carbénicilline à 300 µg/ml, IPTG à 0,5 mM, EGTA à 5 mM et MgCl₂ à 20 mM. Les bactéries sont ensuite mises en culture dans 2,5 ml

de milieu de sécrétion à partir d'une DO_{600nm} initiale de 0,25, jusqu'à obtenir une DO_{600nm} comprise entre 1,5 et 1,8.

ii. Précipitation des protéines du surnageant à l'acide trichloroacétique

Lorsque la DO_{600nm} atteint 1,5-1,8, la culture bactérienne est répartie en 2 x 1,2 ml dans deux microtubes et centrifugée pendant 10 min à 15 000 g à 4°C. Un millilitre de chaque surnageant est transféré dans un nouveau microtube et 250 µl d'acide trichloroacétique à 100% p/v sont ajoutés, soit une concentration finale de 20% v/v. Le mélange surnageant/acide est agité vigoureusement au vortex puis incubé à 4°C pendant 15 min. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 5 min à 15 000 g puis le surnageant est éliminé par renversement. Un lavage des protéines précipitées est alors réalisé. Pour cela, 250 µl d'acétone à -20°C sont ajoutés aux protéines, suivi d'une brève homogénéisation au vortex et d'une centrifugation à 15 000 g à 4°C pendant 5 minutes. L'acétone est éliminée par renversement. Cette étape est réalisée deux fois supplémentaires. A l'issue du dernier lavage, les tubes contenant les protéines sont chauffés pendant 10 min à 50°C afin d'éliminer les derniers restes d'acétone. Cinquante microlitres de tampon Laemmli 1X contenant du β-mercaptoéthanol sont ajoutés au premier tube. Les protéines du premier tube sont récupérées par une agitation au vortex suivie d'une brève centrifugation, puis les 50 µl sont transférés dans le deuxième tube pour lequel la même opération est réalisée. Les protéines solubilisées sont ensuite chauffées à 95°C pendant 5 minutes avant congélation ou analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes suivie d'un Western Blot.

2. Expression de protéines recombinantes chez *E.coli* et purification

i. Conditions d'expression

Les bactéries BL21 DE3 pLysS et Rosetta pLysS sont cultivées en milieu LB ou Terrific Broth complémenté en ampicilline à 50 µg/ml et chloramphénicol à 34 µg/ml. Les tests d'expression sont réalisés dans des volumes de 2 ml alors que les productions en grand volume, en vue d'une purification, sont réalisées dans des volumes de 2 L. L'induction de l'expression de la protéine d'intérêt est réalisée par ajout d'IPTG à une concentration finale

de 0,5 mM lorsque la culture bactérienne atteint une DO_{600nm} égale à 0,8. La production se déroule à 37°C pendant 3h ou pendant 15h à 16°C ou 25°C. A l'issue de l'étape de production, les cultures sont centrifugées à 3 000 g pendant 15 min à 4°C. Les culots bactériens sont ensuite lysés :

- pour les tests d'expression en petit volume, le culot est repris par 200 µl de solution de lyse (FastBreak™ Cell Lysis Reagent (Promega)) diluée à 1X en eau distillée, complétée en DNase I à 100 U/ml). La réaction de lyse est ensuite réalisée à température ambiante pendant 15 min sous agitation. La réaction est stoppée par un refroidissement à 4°C. A l'issue de la lyse, une centrifugation de 20 min à 14 000 g à 4°C est réalisée afin de séparer fractions solubles et insolubles. Les échantillons sont ensuite analysés par migration sur gel de polyacrylamide suivie d'un western-blot.

- pour les expressions en vue d'une purification des facteurs de transcription, les culots correspondant à 500 ml de culture dans lesquels l'induction à l'IPTG a été réalisée sont repris par un volume final de 10 ml de tampon de lyse (Na_2HPO_4 50 mM, Tris 5 mM, NaCl 500 mM, Imidazole 10 mM à pH 7,8) auxquels sont ajoutés 100 µl d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases 100X (Halt Protease Inhibitor Cocktail EDTA-Free, Pierce Biotechnology, Inc). Les cellules sont lysées par traitement aux ultrasons, sur glace, selon le schéma suivant : 4 cycles de 20s d'ultrasons à 60 Volts, entrecoupés de pauses d'une minute. Pour dégrader l'ADN, de la Benzonase™ (Merck-Millipore) à une concentration finale de 100 U/ml est ajoutée au lysat pendant 10 min à 4°C avec agitation.

- pour les expressions en vue d'une purification de la bêta-lactamase, le culot de bactéries issu d'une culture de 100 ml est solubilisé par 15 ml de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH 7.9, 0.1 mM EDTA, 5% Glycérol, 0.1 mM DTT, 0.1 M NaCl) avec inhibiteurs de protéases. La lyse est également réalisée par un traitement aux ultrasons suivant le même cycle, puis un traitement à la Benzonase est appliqué dans les mêmes conditions que pour les facteurs de transcription.

ii. Purification des facteurs de transcription et protéines associées par chromatographie d'affinité

A l'issue de la lyse, une centrifugation de 20 min à 14 000 g à 4°C pour séparer fractions solubles et insolubles. La partie soluble du lysat est incubée pendant 1h à 4°C sous rotation

avec 1 ml de billes Ni-NTA Agarose (Qiagen), préalablement équilibrées dans le tampon de lyse. Le mélange billes/surnageant est ensuite transféré sur une colonne de chromatographie d'une capacité de 10 ml. Deux étapes de lavages sont ensuite réalisées : 6 X 1 ml de tampon de lyse puis 8 X 1 ml de tampon de lavage (Na_2HPO_4 50 mM, Tris 5 mM, NaCl 500 mM, Imidazole 80 mM à pH 7,8) sont déposés successivement sur la résine. La protéine est ensuite éluée par 6 X 500 μl de tampon d'élution (Na_2HPO_4 50 mM, Tris 5 mM, NaCl 500 mM, Imidazole 500 mM à pH 7,8) sur la résine. Les échantillons contenant la protéine d'intérêt sont dialysés à 4°C contre du tampon "Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline" (DPBS) et congelés à -80°C en présence de 5% glycérol.

iii. Resolubilisation de la bêta-lactamase et protéines associées produites en corps d'inclusion

Après l'étape de lyse, du Triton X-100 est ajouté au lysat à une concentration finale de 1% et le mélange est incubé 10 min sur glace. Après une centrifugation de 20 min à 10 000 g à 4°C, le culot est repris par 10 ml de tampon de lyse. Une nouvelle étape de centrifugation est réalisée et le culot est repris par 10 ml de tampon de lyse contenant de l'urée à 8 mM, avant de procéder à une incubation de 30 min à température ambiante sous agitation. Le lysat est alors dialysé contre 500 ml de tampon de repliement (300 mM KCl, 50 mM KH_2PO_4 , 5 mM Imidazole pH 8.0) pendant 24h, avec changement du tampon toutes les 8h. Le produit de dialyse est centrifugé pendant 20 min à 10 000 g et la partie soluble est filtrée à 0.22 μm avant de procéder à la purification par affinité.

iv. Purification de la bêta-lactamase et protéines associées après solubilisation par chromatographie d'affinité

La purification est réalisée sur une colonne BioRad Profinity IMAC, après équilibration par 10 ml de tampon de repliement contenant 10 mM d'Imidazole. Après chargement de l'échantillon, un premier lavage est réalisé par 6 ml de tampon de repliement contenant 10 mM d'imidazole avant de procéder à une première élution par 6 x 1 ml contenant 50 mM d'imidazole. Un deuxième lavage est réalisé en faisant passer 6 ml de tampon de repliement avec 100 mM d'imidazole avant de procéder à une deuxième élution par 6 x 0,5 ml avec 250 mM d'imidazole.

3. Caractérisation des protéines recombinantes

i. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les protéines sont dénaturées et réduites par l'ajout de Tampon Laemmli contenant du SDS et du 2-Mercaptoéthanol, puis séparées par SDS-PAGE, suivie d'une analyse par une coloration au bleu de Coomassie ou par Western Blot. Les échantillons contenant la protéine d'intérêt sont dialysés à 4°C contre du DPBS et congelés à -80°C en présence de 5% de glycérol.

ii. Western Blot

Après transfert sur membrane de nitrocellulose, un blocage en TBS-Tween 0,01%-lait 5% est réalisé pendant 1h à température ambiante. Les anticorps utilisés pour détecter la présence des différentes protéines d'intérêt sont répertoriés dans le Tableau 16.

Tableau 16. Liste des anticorps utilisés en Western Blot.

Cible	Nom et référence	Fournisseur	Conditions
Tag Poly-Histidines	Monoclonal mouse anti-His-HRP (130-092-785)	Miltenyi Biotec	Au 10 000° en TBS-Tween 0,01%-lait 5%, pendant 1h à température ambiante
Bêta-lactamase	Anti-β Lactamase Antibody (AB3738)	Merck-Millipore	Au 5 000° en TBS-Tween 0,01%-lait 5%, pendant 3h à température ambiante
OCT4	Oct-4 Rabbit Monoclonal Antibody (A13998)	Life Technologies	Au 5 000° en TBS-Tween 0,01%-lait 5%, pendant 3h à température ambiante
SOX2	Sox2 (D6D9) XP Rabbit mAb (3579)	Cell Signaling	Au 5 000° en TBS-Tween 0,01%-lait 5%, pendant 3h à température ambiante
IgG de Lapin	Amersham ECL Prime Rabbit IgG, HRP-linked whole Ab (from donkey) (NA934-1ML)	GE Healthcare	Au 5 000° en PBS-Tween 0,05%-BSA 3%, pendant 3h à température ambiante

La révélation est réalisée par chimiluminescence grâce au réactif BioRad "Clarity™ ECL Western Blotting Substrate", substrat de la HRP.

iii. Dosage des protéines

La concentration en protéines est déterminée grâce à l'utilisation d'un kit commercial utilisant l'acide bicinchoninique (BCA Protein Assay Kit, Pierce). En milieu alcalin, les ions cuivre Cu^{2+} sont réduits en Cu^+ par liaison aux protéines, en particulier aux acides aminés suivants : cystéine, tryptophane et tyrosine. L'acide bicinchoninique (BCA) réagit ensuite avec les ions cuivre réduits, le complexe BCA/cuivre absorbant fortement à 562 nm (coloration violette). D'un point de vue expérimental, la solution de BCA est ajoutée aux protéines à doser, selon le protocole du fournisseur, puis le mélange incubé à l'obscurité pendant 30 min à 37°C. La mesure d'absorbance est réalisée à 620 nm sur un lecteur de microplaques. Une gamme de BSA permet de corrélérer l'absorbance à la concentration en protéines de l'échantillon.

iv. Activité bêta-lactamase des protéines rapportrices

L'activité des différentes constructions contenant la bêta-lactamase comme enzyme rapportrice peut être évaluée *in vitro* grâce à la réalisation d'un test colorimétrique. Nous avons développé un test adapté de la bibliographie (Remy *et al.*, 2007), reposant sur l'utilisation d'une céphalosporine chromogène, la nitrocéfine. Ce substrat, normalement jaune (pic d'absorption à 390 nm à pH 7.0) est hydrolysé au niveau du noyau β -lactame conduisant à l'apparition d'un produit rouge (pic d'absorption à 487 nm à pH 7.0). La réaction est réalisée en plaque 96 puits suivant la démarche suivante : la solution mère de nitrocéfine (Calbiochem) est préparée à 20 mM en DMSO ; 10 μl de solution contenant la protéine d'intérêt (au maximum 1 μg) sont ajoutés à 80 μl de tampon sodium phosphate 100 mM à pH 7.3. Une solution de nitrocéfine à 1 mM diluée en tampon sodium phosphate 100 mM à pH 7.3 contenant de l'EDTA à 1 mM est ajoutée extemporanément. L'hydrolyse du substrat est suivie par mesure de l'absorbance à 490 nm pendant 30 min, à température ambiante. Les paramètres enzymatiques sont déterminés grâce au logiciel MikroWin 2000 (Berthold).

v. Test d'affinité des protéines Oct4 sur leur séquence nucléotidique cible (TransAM® Oct-4)

L'influence des différentes séquences de vectorisation sur la fonctionnalité de la protéine Oct4 peut être évaluée grâce à l'utilisation d'un kit commercial développé par la société

Active Motif. La séquence nucléotidique cible du facteur Oct4 est immobilisée au fond des puits d'une plaque 96 puits (fournie dans le kit). Le protocole réalisé suit les instructions du fournisseur. Les échantillons contenant les différentes constructions fusionnées à Oct4 sont dilués en "Complete Lysis Buffer" à des concentrations équivalentes. Un extrait nucléaire de cellules embryonnaires murines ("P19 nuclear extract", Active Motif) est utilisé comme contrôle positif ; une gamme de cet extrait, de 0,5 µg à 5 µg par puits, est réalisé par des dilutions en "Complete Lysis Buffer". Le "Complete Lysis Buffer" seul est utilisé comme référence négative. L'incubation avec la solution de révélation est réalisée pendant 10 min à 37°C à l'abri de la lumière puis l'absorbance est mesurée à 450 nm sur un lecteur de microplaques.

III. Cellules de mammifères

1. Fibroblastes embryonnaires de souris

i. Obtention

Les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) sont obtenus suite à l'accouplement de souris CF-1. L'accouplement est réalisé à J0 entre 00h et 12h et la femelle sacrifiée à J14 de manière à obtenir des cellules à J13,5. Les embryons sont extraits de l'utérus et dilacérés au scalpel puis incubés pendant 10 min à 37°C avec 1 ml de trypsine à 0,25%. Une dissociation mécanique est ensuite réalisée sur un appareil "Gentle MACs Dissociator" (Miltenyi Biotec). Chaque homogénat est réparti dans deux flasques de 75 cm² dans 20 ml de milieu DMEM/F-12 "High Glucose" avec 10% de SVF. Le milieu est changé à 24h afin d'éliminer les cellules non adhérentes et mortes puis les cellules sont récupérées et congelées à 48h. Les MEF sont cultivés en DMEM/F-12 "High Glucose" avec 15% de SVF.

ii. Utilisation des MEF comme support des iPS

a. "Coating" des plaques de culture

Les puits d'une plaque 6 puits sont recouverts par 2 ml d'une solution de gélatine 0,2% p/v filtrée à 0,2 µm. Le "coating" est réalisé pendant 2h à 37°C. Les puits sont rincés avec du DPBS et la plaque conservée à 4°C jusqu'à la mise en culture des cellules.

b. Irradiation et mise en culture des MEF

Les MEF sont utilisés comme support de la croissance des iPS. Pour cela, ils sont irradiés à 60 Grays 24h avant le passage des iPS et réparties en plaque 6 puits sur une couche de gélatine à raison de 250 000 cellules par puits.

2. Lignées cellulaires

Lignée	Référence	Type cellulaire	Milieu de culture
BJ	CRL-2522 (ATCC)	Fibroblastes humains dermiques néonataux à passage 9	DMEM-10% SVF
K562	CCL-243(ATCC)	Progéniteur myéloïde érythroblastique	RPMI-10% SVF
HNDF	C-12300 (PromoCell)	Fibroblastes humains dermiques néonataux à passage 4	DMEM-10% SVF

3. Cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ de sang de cordon

i. Obtention des sangs de cordon

Les sangs de cordon ombilical utilisés sont dédiés à la recherche car les volumes de sang sont insuffisants ou la quantité de cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ insuffisante pour une utilisation en thérapie. Toutefois tous les tests permettant de s'assurer de l'absence de contamination telle que le VIH, les hépatites B et C ou encore la syphilis ont été réalisés. Leur utilisation est soumise au consentement des parents et les échantillons sont anonymes.

ii. Isolement des cellules mononuclées

Le sang de cordon est dilué 4 fois dans du DPBS, et réparti comme suit : 30 ml sont ajoutés délicatement à 15 ml de Ficoll ("Lymphocyte Separation Medium", Lonza) déposés au fond d'un tube à centrifuger de 50 ml. Les cellules sont centrifugées pendant 25 minutes à 800 g à température ambiante, et l'anneau mono-lymphocytaire (Figure 21) est récupéré délicatement par aspiration, après avoir retiré l'excès de surnageant. Deux anneaux sont regroupés par tube de 50 ml et du DPBS est ajouté pour obtenir un volume final de 50 ml. Les cellules sont centrifugées à 400 g pendant 10 minutes, le surnageant est éliminé et tous les culots sont repris par 10 ml de DPBS. Les cellules sont de nouveau lavées avec du DPBS puis comptées à l'aide d'un hémocytomètre. Après centrifugation, le culot de cellules est repris dans du DPBS complété par du SVF à 2% et de l'EDTA à 2 mM à raison de 300 μ l pour $100 \cdot 10^6$ cellules.

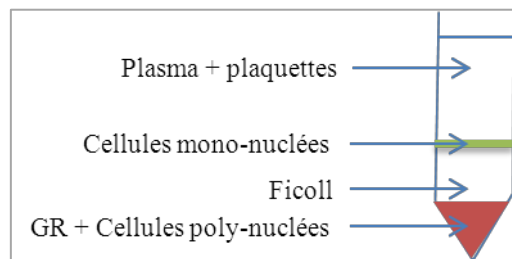


Figure 21. Représentation de l'isolement d'un anneau mono-lymphocytaire sur gradient de Ficoll.

iii. Purification des cellules CD34⁺ par tri magnétique

Les cellules CD34⁺ sont purifiées des autres cellules mononuclées par un tri magnétique grâce au "CD34 MicroBead Kit, human" (Miltenyi Biotec) selon le protocole du fournisseur. Après l'étape finale d'élution, les cellules sont lavées en milieu RPMI-1640 (Life Technologies) contenant 10% de SVF. La pureté est évaluée par l'analyse des marqueurs CD34 et CD45, par cytométrie en flux.

iv. Conditions de culture des cellules CD34⁺ de sang de cordons

Pour les différentes applications ainsi que pour l'amplification *in vitro*, les CD34⁺ sont cultivées en milieu StemPro®-34 SFM (Life Technologies) complété en cytokines :

100 ng/ml Stem Cell Factor (SCF), Interleukine 3 (IL-3), Interleukine 6 (IL-6), Flt3 Ligand (FL) + 10 ng/ml Thyroperoxydase (TPO).

4. Cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches pluripotentes induites (iPS) sont cultivées en milieu KO DMEM F12 High Glucose, KOSR 20%, Glutamax 2 mM, β -mercaptoéthanol 50 μ M, acides aminés non-essentiels (NEAA) 100 μ M, β -FGF 10 ng/ml, sur une couche de cellules MEF irradiées. Pour passer les cellules, une solution de collagénase de type IV à 37°C est ajoutée aux cellules à une concentration finale de 100 U/ml en présence de Rock Inhibitor à 10 μ M. Après une incubation de 10 min à 37°C les cellules sont détachées mécaniquement à l'aide d'un "scraper", puis les iPS sont séparées des MEF par sédimentation. Les iPS sont réparties dans des nouveaux puits contenant des MEF irradiés, à raison de 25 000 cellules par puits. Le milieu est renouvelé de moitié, tous les jours.

IV. Protocoles de vectorisation

Le transport intracellulaire de facteurs de transcription ou de protéines rapportrices grâce aux différents vecteurs est réalisé sur différents types cellulaires : lignées K562 et CD34⁺ pour les cellules non adhérentes et fibroblastes (BJ, HNDF) pour les cellules adhérentes.

1. SST3 de *P. aeruginosa*

i. Injection *in vitro*

La veille de l'injection, la souche de *P. aeruginosa* portant le plasmide pEAI codant pour la protéine d'intérêt est mise en culture sur la nuit dans 2 ml de milieu LB avec de la carbénicilline à 300 μ g/ml. Le lendemain, les bactéries sont lavées par 1 ml de LB après une centrifugation de 3 minutes à 6 700 g permettant d'éliminer le milieu de culture. Les bactéries sont ensuiteensemencées à une DO_{600nm} initiale de 0,25 en LB contenant de l'IPTG à 0,5 mM et de la carbénicilline à 300 μ g/ml, jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 1,5. Les bactéries sont ensuite lavées deux fois avec du milieu de culture, RPMI ou DMEM, selon le type cellulaire cible et la DO est ajustée à 1 dans ce même milieu. Juste avant

l'injection, le milieu de culture des cellules est changé pour du milieu sans sérum puis les bactéries sont ajoutées aux cellules à différents ratios ou MOI ("Multiplicity of Infection", soit le nombre de bactéries par cellule cible). L'ensemble est centrifugé pendant 10 min à 800 g avant d'être mis en incubation pendant 1h à 37°C dans une étuve avec 5% de CO₂. Pour l'injection des CD34+, les cellules sont immobilisées grâce à la réalisation d'un "coating" à l'aide d'une IgG1κ anti-CD43 (BD Pharmingen, 551457) diluée à 1 µg/ml en DPBS. Le "coating" est réalisé sur la nuit à 4°C, la veille de la mise en culture des cellules.

ii. Traitement photochimique d'atténuation des bactéries KBMA

Le protocole KBMA (Killed But Metabolically Active) permettant l'inhibition photochimique de la prolifération bactérienne suit les mêmes lignes directrices qu'une injection *in vitro* classique à quelques exceptions : une fois les bactéries cultivées jusqu'à une DO_{600nm} comprise entre 0,45 et 0,5, une solution d'amotosalène-HCl est ajoutée à la culture à une concentration finale de 10 µM. La croissance est ensuite arrêtée lorsque la DO_{600nm} atteint 0,9-1, chaque ml de culture est alors transféré dans le puits d'une plaque 6 puits et le traitement aux UV à 365 nm est appliqué pendant 40 min à 7,2J/cm². Les bactéries sont ensuite lavées, diluées et co-incubées de la même manière qu'avec le protocole classique.

iii. Bactéries prêtes à injecter : congélation et décongélation

Une fois la phase de production achevée (DO_{600nm} finale de 1,5 atteinte) les bactéries sont réparties en aliquots de 1 ml à une DO_{600nm}=1 puis congelées à -80°C dans un milieu LB contenant 20% de glycérol. Le jour de l'utilisation, les bactéries sont décongelées lentement à 4°C avant d'être lavées deux fois en milieu de culture, diluées et co-incubées avec les cellules cibles.

iv. Remise en culture des cellules eucaryotes injectées

Après injection, du SVF à une concentration finale de 10% ainsi qu'un mélange d'antibiotiques comprenant de la gentamicine à 20 µg/ml et de la ciprofloxacine à 20 µg/ml est ajouté aux cellules, qui sont remises en culture à 37°C sous 5% de CO₂.

v. Préparation des cellules pour l'analyse de l'efficacité d'injection

Après injection, un traitement antibiotique "flash" est réalisé afin d'éliminer le plus de bactéries possibles pour procéder à l'analyse. Pour cela un mélange de tobramycine et de ceftazidime à des concentrations finales de 50 µg/ml est ajouté aux cellules pendant 30 min à 37°C. A l'issue de cette incubation, un lavage est réalisé et les cellules sont maintenues en milieu de culture contenant de la gentamicine à 20 µg/ml.

2. Zebra MD11

Juste avant d'ajouter le peptide de transduction MD11 couplé à un facteur de transcription ou une protéine rapportrice (MD11-X), le milieu de culture des cellules est changé pour du DPBS. Les protéines d'intérêt fusionnées à MD11 sont décongelées rapidement à 37°C et ajoutées aux cellules à différentes concentrations pendant 1h à 37°C. A l'issue de l'étape d'incubation, le milieu des cellules est changé et les cellules sont remises en culture jusqu'à l'analyse.

3. Dodécaèdre de l'adénovirus de type 3

La première étape consiste à co-incuber le dodécaèdre avec la protéine d'intérêt fusionnée au domaine WW3 afin de permettre l'association. Cette étape est réalisée pendant 1h à température ambiante. Le mélange Dd/WW3-Protéine X est ensuite incubé avec les cellules cibles pendant 2h à 37°C, puis les cellules sont rincées avec du DPBS avant de procéder à l'analyse.

V. Analyses cellulaires

1. Efficacité de vectorisation

Les efficacités de vectorisation sont évaluées grâce à l'utilisation de protéines rapportrices, par cytométrie et microscopie (épifluorescence et confocale). Pour la cytométrie, les cellules en suspension sont cultivées directement en tubes de cytométrie tandis que les

cellules adhérentes sont traitées en plaque de culture puis transférées au dernier moment dans des tubes de cytométrie après décollement par la trypsine.

i. Bêta-lactamase

a. Analyse de l'activité

L'efficacité de vectorisation est évaluée *in vitro* par observation et mesure de l'activité de la bêta-lactamase, grâce à l'utilisation d'un substrat fluorogénique, le CCF2-AM (Life Technologies). Pour cela, une solution de CCF2 6X est préparée comme suit : pour 1 ml de solution, ajouter 12 µl de réactif A, 60 µl de réactif B, 925 µl de réactif C et 52,5 µl de réactif D. La solution est ajoutée aux cellules à une concentration finale de 1X et le mélange est incubé à température ambiante pendant 1h30 à l'obscurité. A l'issue de cette incubation, les cellules sont lavées avec du milieu de culture contenant de la gentamicine à 20 µg/ml puis analysées par microscopie en fluorescence ou cytométrie en flux en utilisant les paramètres suivants : $\lambda_{\text{excitation}}$: 405 nm ; $\lambda_{\text{émission substrat}}$: 520 nm (vert) ; $\lambda_{\text{émission produit}}$: 447 nm (bleu). Pour l'analyse par cytométrie de cellules adhérentes, les cellules sont décollées par un traitement à la trypsine.

b. Contrôle inhibiteur de l'activité

L'activité bêta-lactamase est inhibée *in vitro* par ajout d'acide clavulanique. Une fois l'injection de l'enzyme réalisée, l'inhibiteur est ajouté dans le milieu de culture à une concentration finale de 5 µg/ml soit 40 µM, pendant 30 min à 37°C, à l'issue desquelles la solution de CCF2 est ajoutée et le signal analysé.

c. Immunomarquage

Les cellules sont fixées par 500 µl de solution "Fixation/Permeabilization" (BD Pharmingen) pendant 10 min, avant d'être lavées en tampon Perm/Wash (BD Pharmingen). Un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la bêta-lactamase (Bla) (Millipore) dilué au 100^e en tampon Perm/Wash est ensuite incubé avec les cellules pendant 1h à température ambiante. Après un nouveau lavage en tampon Perm/Wash, un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin, couplé au FITC (Jackson ImmunoResearch), dilué au 100^e en DPBS, est

ajouté aux cellules pendant 1h à température ambiante, à l'abri de la lumière. Après un dernier lavage en tampon Perm/Wash, les cellules sont analysées en cytométrie en flux.

ii. GFP

La GFP est détectée par analyse/mesure de fluorescence en microscopie ou cytométrie sur le canal/filtre FITC : excitation maximale à 488 nm et pic d'émission à 507 nm.

iii. Immunomarquage du Dodécaèdre

Les cellules sont fixées par 500 µl de méthanol froid (-20°C) pendant 10 min, avant d'être lavées en DPBS. Un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le Dd (fourni par le Docteur Jadwiga Chroboczek, laboratoire TIMC-IMAG), dilué au 100^e en DPBS est ensuite incubé avec les cellules pendant 1h à température ambiante. Après un nouveau lavage en DPBS, un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin, couplé au FITC (Jackson ImmunoResearch), dilué au 100^e en DPBS, est ajouté aux cellules pendant 1h à température ambiante, à l'abri de la lumière. Après un dernier lavage en DPBS, les cellules sont analysées en cytométrie en flux.

2. Viabilité

Les mesures de viabilité cellulaire sont réalisées par analyse de l'incorporation d'Annexine V et de 7-Aminoactinomycine D (7-AAD), indiquant respectivement le pourcentage de cellules en apoptose et nécrose. Les expériences sont réalisées grâce aux réactifs de BD Pharmingen : Annexin V-APC et 7-AAD. Brièvement, le milieu de culture des cellules est remplacé par 100 µl d'une solution de 7-AAD/Annexin V préparée comme suit : 90 µl de tampon "Annexin V Binding Buffer" (BD Pharmingen), 5 µl d'Annexin V-APC et 5 µl de 7-AAD. Les cellules sont conservées à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à l'analyse par cytométrie en flux, à 650 nm pour le 7-AAD et 660 nm pour l'APC.

3. Variations de l'expression génique

i. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits des cellules grâce au kit "PureLink RNA Mini Kit" (Life Technologies). Un traitement à la DNase I est réalisé directement sur la colonne selon les instructions du fournisseur, pendant 15 min à température ambiante. L'élution est réalisée dans un volume de 30 µl d'eau déionisée certifiée "RNase-Free". Les ARN sont stockés à -80°C.

ii. Transcription inverse (RT-PCR)

Les réactions de RT-PCR sont réalisées immédiatement après l'extraction d'ARN, grâce au kit "First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)" (Roche Applied Sciences), à partir de 1 µg d'ARN purifié. Un oligo(dT) est utilisé comme amorce unique pour la synthèse, selon le programme suivant :

Etapes	Température	Temps (min)
Hybridation	25°C	10
Elongation	42°C	60
Dénaturation	99°C	5
Refroidissement	4°C	5

Les échantillons sont stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

iii. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

a. Listes des amorces et cibles

Les caractéristiques des amorces utilisées pour mesurer les variations de l'expression des différents gènes cibles sont présentées dans Tableau 17. Le gène *hprt* (code pour l'Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase) est utilisé comme gène de référence.

Tableau 17. Liste des amorces utilisées pour les réactions de PCR quantitative en temps réel.

Cible		Séquence (5'-3')	Taille de l'amplicon (nt)	Saut d'intron
<i>hprt</i>	Forward	GAC-CAG-TCAA-CAG-GGG-ACA-T	95	✓
	Reverse	GTG-TCA-ATT-ATA-TCT-TCC-ACA-ATC-AAG		
<i>lin28a</i>	Forward	GAA-GCG-CAG-ATC-AAA-AGG-AG	115	✓
	Reverse	GCT-GAT-GCT-CTG-GCA-GAA-GT		
<i>nanog</i>	Forward	ATG-CCT-CAC-ACG-GAG-ACT-GT	67	✓
	Reverse	CAG-GGC-TGT-CCT-GAA-TAA-GC		
<i>pou5f1</i>	Forward	CTT-CGC-AAG-CCC-TCA-TTT-C	88	✗
	Reverse	GAG-AAG-GCG-AAA-TCC-GAA-G		
<i>sox2</i>	Forward	GGG-GGA-ATG-GAC-CTT-GTA-TAG	85	✗
	Reverse	GCA-AAG-CTC-CTA-CCG-TAC-CA		

b. Mélange réactionnel et programme

Les réactions de qPCR sont réalisées grâce au mix "FastStart SYBR Green Master" (Roche Applied Sciences), à partir de 5 µl d'ADNc dans un volume réactionnel final de 20 µl.

c. Appareil et analyse

Les mesures de PCR quantitative sont réalisées par suivi de l'incorporation de SYBR Green en fonction du temps sur un thermocycleur Eppendorf Mastercycler® Ep Realplex

2. Le programme suivant est appliqué :

Etapes	Température	Temps	Répétitions
Dénaturation initiale	95°C	10 min	Ø
Elongation	95°C	15 s	X 40
Dénaturation	60°C	60 s	
Dissociation	Gradient 60→95°C	20 min	Ø

Les données sont analysées grâce au logiciel Eppendorf Realplex. La formule suivante est utilisée pour déterminer les variations (Fold Change) d'une condition testée par rapport à une condition contrôle :

$$\text{Fold Change} = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{cible}} - \Delta Ct_{\text{référence}}$$

$$\Delta Ct = Ct_{\text{test}} - Ct_{\text{contrôle}}$$

Avec :

- *Ct* : correspond au point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point apparaît au début de la phase exponentielle. Le *Ct* est calculé par défaut par le logiciel.
- *Test* : condition à analyser
- *Contrôle* : condition contrôle
- *Cible* : gène cible dont on cherche à mesurer l'expression
- *Référence* : gène de référence, dont l'expression est supposée stable au cours du temps

4. Microscopie confocale

Des expériences de microscopie confocale sont réalisées pour mettre en évidence la localisation des facteurs de transcription vectorisés. Ces expériences sont réalisées sur des fibroblastes BJ.

i. Préparation des échantillons

Les fibroblastes BJ sontensemencées à 40 000 cellules par chambre en chambres Lab-Tek 8 en borosilicate de type I (Nunc), dans 400 µl de milieu, la veille de la vectorisation. A l'issu de la co-incubation cellules/vecteurs, les cellules sont lavées en DPBS et remises en milieu de culture avec antibiotiques. A 1h, 3h ou 15h après remise en culture, les cellules sont lavées deux fois en DPBS puis fixées grâce au tampon Fix/Perm du kit "Transcription Factor Buffer Set" (BD Pharmingen), pendant 45 min à 4°C. Les cellules sont lavées deux fois en tampon Perm/Wash du même kit. Un blocage avec 5% de SVF dilué en tampon Perm/Wash est ensuite réalisé pendant 1h à température ambiante avant de procéder à l'immunomarquage des facteurs, pendant 45 min à 4°C et à l'obscurité, à l'aide des

anticorps conjugués suivants : IgG1 de souris anti-Oct4 couplée Alexa Fluor 488, IgG1 de souris anti-Nanog couplée Alexa Fluor 647 et IgG1 de souris anti-Sox2 couplée Alexa Fluor 647. Les cellules sont lavées trois fois en tampon Perm/Wash, puis un marquage du Noyau au DAPI est réalisé pendant 5 min à l'obscurité. Un lavage est réalisé avec du tampon Perm/Wash. Les cellules sont conservées dans ce tampon à 4°C et à l'obscurité, jusqu'à l'analyse.

ii. Analyse

Les analyses sont réalisées au sein du plateau spécialisé en microscopie photonique et imagerie cellulaire de l'Institut Albert Bonniot (Centre de Recherche Inserm/UJF (U823)), avec l'aide précieuse d'Alexei Grichine et Mylène Pezet. Les acquisitions sont réalisées sur la station de microscopie confocale multiparamétrique Dynascope, développée en collaboration entre la société Carl Zeiss et l'IAB. Les données sont analysées grâce au logiciel Zen (Carl Zeiss).

5. Analyses phénotypiques

i. Cytométrie en flux

a. Cytomètre et logiciel

Les échantillons sont analysés à l'aide d'un cytomètre BD FACSCanto II (BD Biosciences) et les données traitées à l'aide du logiciel BD FACSDiva (BD Biosciences).

b. Liste des anticorps couplés pour la cytométrie

Les anticorps couplés à des fluorochromes utilisés pour les différentes analyses réalisées en cytométrie en flux sont présentés dans le Tableau 18.

Tableau 18. Liste des anticorps couplés utilisés en cytométrie en flux.

Cible	Localisation	Type	Fluorochrome	Fournisseur	Référence
CD34	membranaire	IgG2a souris	APC	Miltenyi Biotec	130090954
CD34	membranaire	IgG2a souris	FITC	Miltenyi Biotec	130081001
CD34	membranaire	IgG2a souris	Phycoérythrine (PE)	Miltenyi Biotec	130081002
CD43	membranaire	IgG1 souris	FITC	BD Pharmingen	555475

CD45	membranaire	IgG2a souris	APC	Miltenyi Biotec	130091230
CD45	membranaire	IgG2b souris	FITC	Beckman Coulter	6607013
CD49f	membranaire	IgG2a rat	Phycoérythrine (PE)	BD Pharmingen	555736
E-Cadherin	intracellulaire	IgG1 souris	Alexa Fluor 647 (AF647)	BD Pharmingen	560062
Tag Histidine	-	IgG1 souris	Phycoérythrine (PE)	Miltenyi Biotec	130092691
Nanog	intracellulaire	IgG1 souris	Alexa Fluor 647 (AF647)	BD Pharmingen	561300
Oct-4 A	intracellulaire	IgG1 souris	Alexa Fluor 488 (AF488)	BD Pharmingen	561628
Phosphatase Alcaline	intracellulaire	IgG1 souris	Alexa Fluor 488 (AF488)	BD Pharmingen	561495
Sox2	intracellulaire	IgG1 souris	Alexa Fluor 647 (AF647)	BD Pharmingen	562139
SSEA4	membranaire	IgG3 souris	Phycoérythrine (PE)	BD Pharmingen	560128
TRA-1-81	membranaire	IgM souris	FITC	BD Pharmingen	560194

c. Marquages membranaires et intracellulaires directs

Les cellules sont transférées en tubes à cytométrie après décollement à la trypsine ou à la collagénase, selon le type cellulaire, puis lavées en DPBS.

Les marquages membranaires sont réalisés pendant 1h à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cellules sont lavées en DPBS avant l'analyse.

Pour les marquages intracellulaires, les cellules sont fixées par 500 µl de solution "Fixation/Permeabilization" pendant 30 min à 4°C. Après deux lavages avec le tampon Perm/Wash, le marquage est réalisé pendant 1h30 à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cellules sont lavées avec le tampon Perm/Wash avant de procéder à l'analyse.

ii. Marquage de l'activité Phosphatase Alcaline

L'activité phosphatase alcaline des cellules est évaluée grâce à l'utilisation d'un substrat fluorigène (Alkaline Phosphatase Live Stain 500X, Life Technologies). Le marquage est réalisé sur cellules vivantes. Le milieu de culture est retiré des cellules, qui sont lavées deux fois avec du DMEM sans sérum. Le réactif est dilué à 1X en DMEM puis le milieu contenant le substrat est ajouté aux cellules, pendant 30 min à 37°C. A l'issue de l'incubation, les cellules sont lavées deux fois en DMEM avant d'être analysées par microscopie de fluorescence avec un filtre FITC (Excitation : 465-495 nm ; Emission : 515-555 nm). Après analyse, les cellules sont remises en culture dans un milieu adapté.

VI. Reprogrammation

1. Protocoles de reprogrammation par le SST3 de *P. aeruginosa*

Les protocoles de reprogrammation de CSH de sang de cordons et de fibroblastes dermiques néonataux réalisés avec le SST3 de *P. aeruginosa* sont présentés en Figure 22.

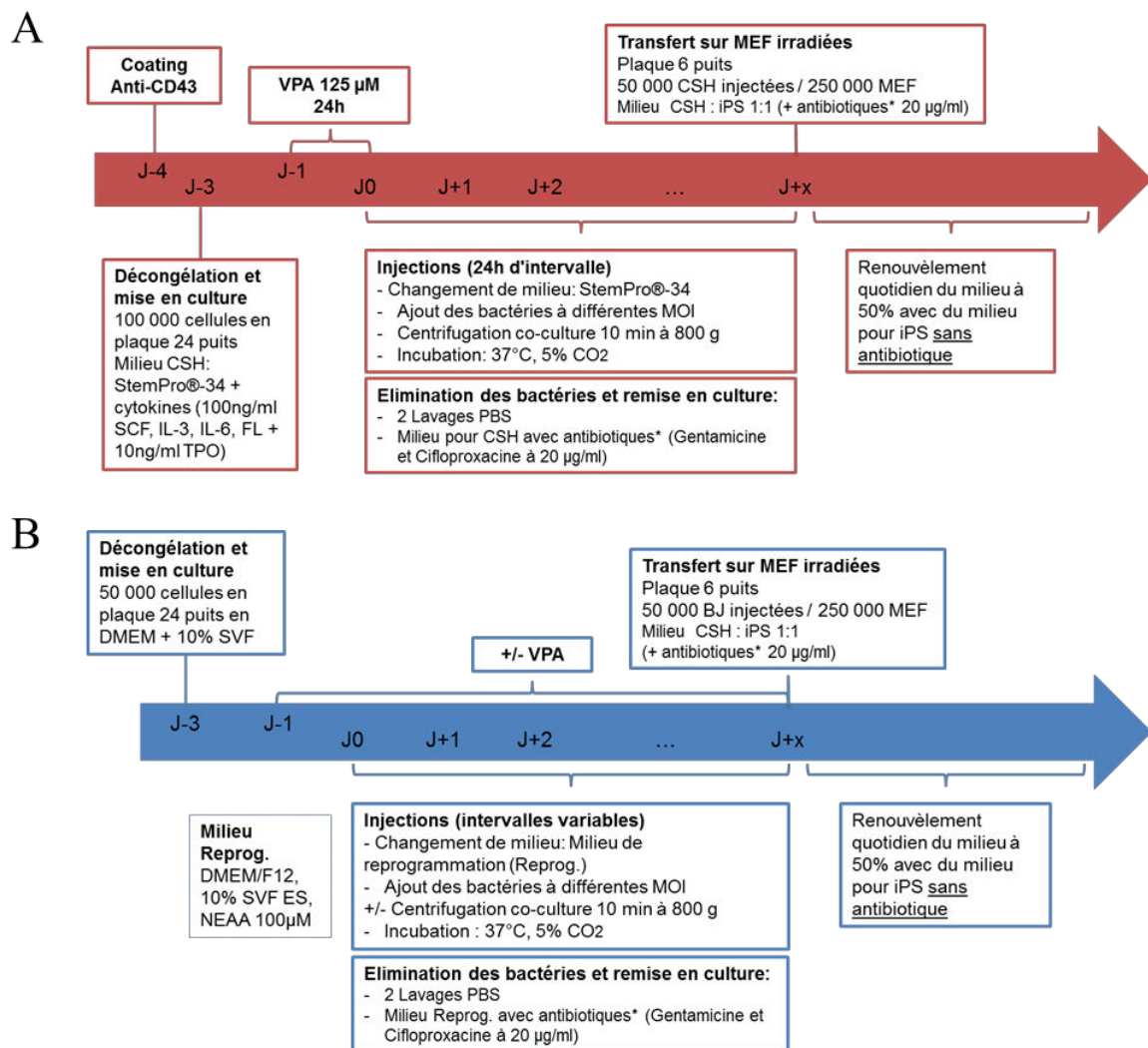


Figure 22. Protocoles de reprogrammation de CSH de sang de cordon (A) et de fibroblastes dermiques néonataux (B).

2. Protocole de reprogrammation par le virus Sendai

i. Fibroblastes BJ

Les fibroblastes sont mis en culture la veille en plaque 6 puits de manière à obtenir une confluence comprise entre 50 à 80% le jour de la transduction, soit 2.10^5 à 3.10^5 cellules par puits, en DMEM-10% SVF. La transduction est réalisée pendant 24h à 37°C dans une étuve sous 5% de CO₂, en utilisant le ratio de vecteurs suivant : CytoTune® 2.0 KOS à MOI = 5, CytoTune® 2.0 hc-Myc à MOI = 5 et CytoTune® 2.0 hKlf4 à MOI = 3. Le milieu est renouvelé complètement à J+1 de manière à retirer le virus. Le milieu est renouvelé de 50% quotidiennement jusqu'à J+7, date à laquelle les cellules sont transférées sur des MEF irradiées, dans un milieu composé de milieu pour fibroblastes : milieu pour iPS 1:1. Le milieu de culture est renouvelé de moitié tous les jours avec du milieu pour iPS.

ii. CD34⁺ de sang de cordon

Les CD34⁺ sont mises en culture à $2,5.10^5$ cellules par puits en plaques 24 puits à J-3 avant la transduction dans 500 µl de milieu StemPro®-34 SFM complémenté en cytokines. A J-2, 500 µl de milieu sont ajoutés ; à J-1, le milieu est changé à 50%. La transduction est réalisée pendant 24h à 37°C dans une étuve sous 5% de CO₂, en utilisant le ratio de vecteurs suivant : CytoTune® 2.0 KOS à MOI = 5, CytoTune® 2.0 hc-Myc à MOI = 3 et CytoTune® 2.0 hKlf4 à MOI = 3. Le milieu est renouvelé complètement à J+1 de manière à retirer le virus. Les cellules sont transférées sur des MEF irradiées à J+3, dans un milieu composé de milieu pour CD34⁺ : milieu pour iPS 1:1. Le milieu de culture est renouvelé de moitié tous les jours avec du milieu pour iPS.

RESULTATS

L'objectif de ce projet de thèse est de proposer et développer un nouveau vecteur de protéines pour la reprogrammation sécurisée de cellules somatiques en iPS à potentiel thérapeutique. La finalité du projet est de générer, à partir de ces iPS, des CSH en conditions précliniques, afin de traiter les hémopathies malignes mais aussi de produire des globules rouges *in vitro* dans le but de trouver une alternative durable à la transfusion sanguine.

Ces dernières années, des méthodes de génération d'iPS non intégratives ont vu le jour, autorisant ainsi l'obtention de cellules pluripotentes dénuées d'aberrations génétiques. Les méthodes les plus prometteuses en termes de sécurité sont basées sur le transfert des facteurs de reprogrammation directement sous forme de protéines, éliminant ainsi tout apport de matériel génétique exogène. Cependant, ces méthodes sont relativement fastidieuses et inefficaces (jusqu'à 0,06% d'efficacité sur des fibroblastes humains, Lee *et al.*, 2012) contrairement aux méthodes intégratives (jusqu'à 0,5% d'efficacité sur des fibroblastes humains avec un vecteur lentiviral inductible, Schlaeger *et al.*, 2014). La mise au point de nouveaux vecteurs de transfert de protéines pour la génération d'iPS représente donc un défi majeur de cette nouvelle ère de recherche et développement sur les iPS et leurs applications.

L'équipe TheREx du laboratoire TIMC-IMAG est spécialisée dans le développement de vecteurs de protéines, notamment pour la vaccination anti-tumorale.

Parmi ces vecteurs, nous trouvons :

- le SST3 de *P. aeruginosa*, véritable micro-seringue naturelle. Grâce au couplage avec la séquence codant des 54 premiers acides aminés de l'Exotoxine S (ExoS54), il est possible d'injecter une protéine d'intérêt directement dans le cytoplasme des cellules cibles.
- le domaine minimal MD11 dérivé de la protéine Zebra du virus EBV. Ce peptide de transduction de 42 acides aminés est capable de traverser la membrane plasmique des cellules eucaryotes par un mécanisme de translocation directe, tout en transportant une protéine cargo.
- Le Dd de l'Ad3, particule pseudo-virale composée d'un assemblage de 60 unités d'une protéine de la capsid du virus, la base du penton. Ce complexe est capable de pénétrer au sein des cellules par un mécanisme d'endocytose. Grâce au couplage d'un domaine

adaptateur WW3 de Nedd4, il est possible de fixer par affinité jusqu'à 60 protéines d'intérêt par dodécaèdre.

Les cellules sources sélectionnées pour générer des iPS sont les cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ de sang de cordon ombilical et les fibroblastes humains :

- Les CD34⁺ de sang de cordon constituent l'un des matériaux biologiques les plus sûrs étant donné que ces cellules n'ont subi que très peu de divisions, source de mutations spontanées, et n'ont pas ou très peu été exposées aux agents mutagènes tels que les UV ou certains polluants. De plus les sangs de cordon prélevés à usage thérapeutique sont stockés et référencés dans les banques de l'EFS, avec les typages HLA et groupes sanguins associés disponibles. Les cellules utilisées pour les étapes de mise au point proviennent de poches dédiées à la recherche, pour lesquelles l'absence d'agents infectieux est également certifiée.
- Les fibroblastes, facilement disponibles à partir de biopsie de peau, ouvrent la voie à des perspectives en médecine régénérative avec la possibilité de réaliser des autogreffes diminuant considérablement les risques de rejet ou de la maladie du greffon contre l'hôte.

Une première partie du travail a été consacrée à la comparaison de différents vecteurs selon plusieurs critères. Le vecteur sélectionné à l'issue de cette étape a ensuite été optimisé dans l'optique de mettre au point un protocole efficace de génération d'iPS, à partir de fibroblastes et de CSH de sang de cordon.

CHAPITRE 1

Développement et comparaison des vecteurs protéiques pour la reprogrammation cellulaire

Une grande partie du travail a été dédiée à la mise au point des outils, en particulier à la construction génétique, à l'expression ainsi qu'à la purification des facteurs de transcription couplés aux séquences des différents domaines de vectorisation, à savoir ExoS54 pour le SST3, le domaine minimal MD11 de la protéine Zebra du virus EBV assurant une translocation directe via la membrane plasmique ainsi que le domaine WW3 de l'ubiquitine ligase Nedd4 permettant le couplage au Dd de l'Ad3. Pour des raisons pratiques, seuls les facteurs Oct4 et Sox2, présents dans la plupart des protocoles de reprogrammation, ont été utilisés pour comparer les vecteurs sur différents critères, à savoir la facilité de production et de purification, ainsi que l'influence de la séquence de transport sur l'interaction des facteurs de transcription avec leur séquence d'ADN cible. L'autre critère de sélection utilisé est l'efficacité de vectorisation, c'est-à-dire la capacité de chaque vecteur à transporter efficacement des protéines d'intérêt au sein de cellules cibles, à la fois en terme de quantité de protéines transportées mais aussi de pourcentage de cellules injectées. Ces deux derniers éléments ont pu être déterminés grâce à l'utilisation de protéines rapportrices, la GFP et la bêta-lactamase (Bla).

I. Production et purification des vecteurs et facteurs de transcription

1. Présentations des plasmides et souches d'expression

Les séquences d'ADN codant pour les différents facteurs de transcription ont été clonées au sein des différents vecteurs d'expression, à savoir le pEAI3S54 (pEAI) pour la production et sécrétion par *P. aeruginosa* et le pET15b pour l'expression en *E. coli*.

i. *P. aeruginosa* et plasmide pEAI

Le pEAI (présenté dans l'introduction), a la particularité de posséder un site de clonage multiple situé en aval de la séquence codant pour les 54 premiers acides aminés de l'exotoxine S (ExoS54). Il a été montré au sein de l'équipe TheREx que cette séquence était optimale pour la translocation d'une protéine d'intérêt via le SST3 (Brevet WO2005/049644A2 ; Epaulard *et al.*, 2006).

Cette technologie basée sur cette ingénierie du SST3 a permis de mettre au point des procédés de production extracellulaire de protéines recombinantes directement dans le surnageant de culture (Derouazi *et al.*, 2008) mais aussi l'injection *in vivo* de peptides antigéniques à visée anti-tumorale (Le Gouëllec *et al.*, 2013 ; Wang *et al.*, 2012). En outre, cette séquence n'a démontré aucun caractère cytotoxique. Ceci est cohérent avec la structure même de la protéine ExoS, dont la toxicité est portée par les domaines Rho-GAP et ADP-Ribosyl-Transférase, constitués respectivement par les acides aminés 96-233 et 233-453 (Deng and Barbieri, 2008) qui ne sont donc pas présents dans les constructions.

Les plasmides pEAI recombinants, obtenus par insertion des séquences nucléiques des différents facteurs de transcription, ont été utilisés pour transformer trois souches de *P. aeruginosa* : (i) CHA-OST, dérivée de l'isolat clinique CHA mais pour laquelle les séquences génomiques codant pour les deux toxines ExoS et ExoT ont été supprimées ; (ii) CHA-OST-ΔuvrAB, ayant subi la délétion des séquences codant pour les endonucléases UvrA et UvrB, deux enzymes impliquées dans la réparation par excision de nucléotides des dommages causés à l'ADN ; (iii) CHA-OST-BD, incapable d'injecter puisque les séquences codants pour les deux protéines structurales PopB et PopD, formant le pore dans la membrane de la cellule cible, ont été supprimées.

ii. *E. coli* et plasmide pET15b

Le pET15b est un plasmide d'expression permettant la surexpression de protéines recombinantes en système *E. coli*, grâce à la présence d'un promoteur fort T7 sous le contrôle d'une polymérase T7 (élément DE3) en aval d'un promoteur *ptac* inductible par l'IPTG. Deux souches d'expression ont été utilisées : BL21 (DE3) pLysS et Rosetta™ (DE3) pLysS, les deux possédant un plasmide codant pour le lysozyme, permettant d'inhiber la fuite d'expression liée au promoteur T7. La souche Rosetta possède également sur ce plasmide les séquences des ARN de transfert correspondant aux codons rares chez *E. coli*, à savoir : AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC et CGG.

2. Biologie moléculaire : obtention des différentes constructions et souches

Différentes stratégies de biologie moléculaire ont été employées afin de construire les plasmides portant les séquences des facteurs Oct4 et Sox2, et de la protéine reportrice Bla, seules ou couplées aux séquences codant pour les différents domaines de vectorisation tels que ExoS54 pour le SST3, MD11, ou domaine adaptateur tel que WW3 pour l'association au Dd.

La séquence de Bla a été générée sous la forme d'un gène synthétique couplé aux séquences MD11 ou WW3, et inséré dans deux plasmides pUC57. Nous avons ajouté un domaine poly-glycine (G5) entre Bla et les différents domaines afin de créer un linker peptidique créant un espace entre les deux protéines fusionnées dans l'optique de limiter la perte d'activité de l'enzyme. L'ajout de sites de restrictions entre les différentes séquences d'intérêt permet de modifier les constructions à façon.

Les séquences nucléotidiques codant pour les facteurs Oct4 et Sox2 ont été amplifiées à partir des plasmides pcDNA3.3-Oct4 et pcDNA3.3-Sox2, à l'aide de différentes paires d'amorces, portant des séquences de restriction aux extrémités, permettant de réaliser des clonages dans les différents vecteurs d'expression.

i. Constructions avec le plasmide pET15b

Pour ce qui est des séquences non couplées, les cDNA des deux facteurs et de Bla ont été amplifiés par PCR à partir des plasmides pcDNA3.3 et pUC57, respectivement, à l'aide d'amorces permettant d'ajouter les sites NdeI et BamHI aux extrémités 5' et 3', respectivement, puis insérés au sein du plasmide pET15b après coupure par les enzymes correspondantes et ligation.

Les séquences MD11-G5-Bla et WW3-G5-Bla ont ensuite été extraites des pUC57 puis insérées dans le plasmide pET15b afin de générer les constructions pET15b-MD11-G5-Bla et pET15b-WW3-Bla (Figure 23). Les séquences codant Oct4 et Sox2 ont pu être insérées dans ces deux plasmides à la place de Bla afin de générer les plasmides d'expression suivants : pET15b-MD11-Oct4, pET15b-MD11-Sox2, pET15b-WW3-Oct4, pET15b-WW3-Sox2. Pour cela les séquences des deux facteurs ont été amplifiées à partir des plasmides pcDNA3.3, avant de réaliser une double digestion NotI/NheI suivie d'une ligation (Figure 24A).

ii. Constructions avec le plasmide pEAI

La séquence codant Bla a été extraite à partir du plasmide pUC57-WW3-Bla par une double digestion AgeI/BglII, puis insérée au sein du pEAI (Figure 23).

Les séquences des facteurs Oct4 et Sox2 ont été insérées dans le pEAI à la place du cDNA codant pour la partie C-terminale de l'ovalbumine (Ova) : pour cela, le plasmide pEAI-Ova a été digéré par les enzymes BamHI et NdeI. En parallèle, les séquences des deux facteurs ont été amplifiées à partir des plasmides pcDNA3.3 à l'aide d'amorces permettant l'ajout d'un site BamHI en 5' et d'un site NdeI en 3', puis insérées dans le plasmide digéré après restriction enzymatique et ligation. Cette stratégie permet de conserver le tag poly-histidines en position C-terminale, utile pour la détection des facteurs de transcription (Figure 24B).

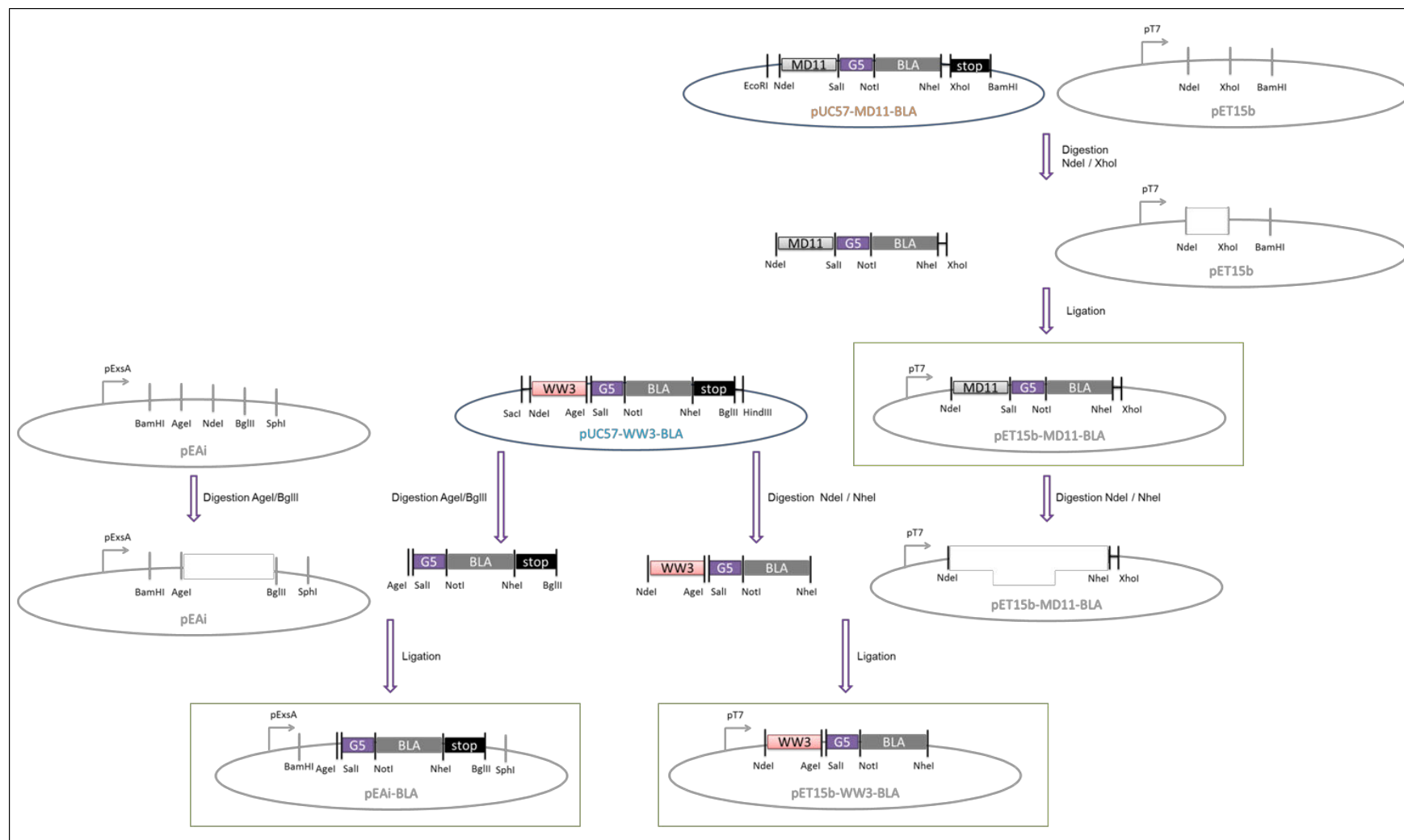


Figure 23. Stratégie de clonage de Bla en association avec les différentes séquences de vectorisation eu sein du pEAI et du pET15b.

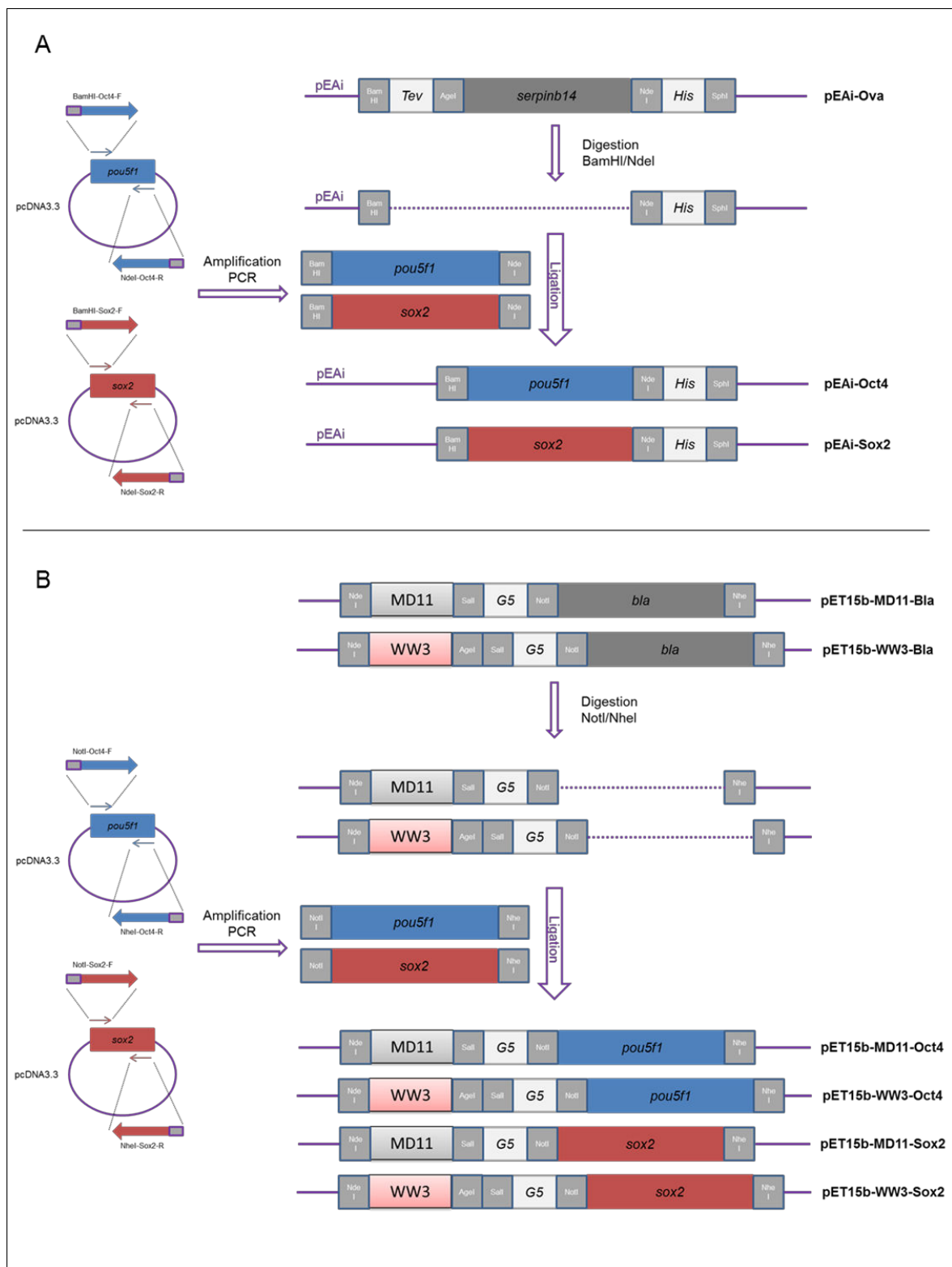


Figure 24. Stratégie de clonage des facteurs Oct4 et Sox2 en association avec les différentes séquences de vectorisation eu sein du pEAI (A) et du pET15b (B).

Les propriétés des protéines recombinantes codées par les différents plasmides générés sont présentées dans le Tableau 19.

Tableau 19. Caractéristiques physicochimiques des protéines exprimées à l'aide des différents vecteurs

Protéine	Poids moléculaire (kDa)	Point isoélectrique	Hydrophobicité (GRAVY index)
Bla	31.4	6.06	-0.294
MD11-Bla	39.9	8.57	-0.391
WW3-Bla	38.2	5.97	-0.375
Oct4	41	6.32	-0.467
Sox2	36.7	9.75	-0.757
ExoS54-Oct4	45.5	5.99	-0.471
ExoS54-Sox2	40.8	9.66	-0.763
MD11-Oct4	49.5	8.54	-0.515
MD11-Sox2	45.3	9.90	-0.757
WW3-Oct4	47.8	6.18	-0.506
WW3-Sox2	43.6	9.61	-0.755

3. Production des facteurs de transcription chez *E.coli* et purification

Le premier critère d'évaluation des différents vecteurs envisagés pour la reprogrammation cellulaire consiste à vérifier que les facteurs de transcription couplés à différentes séquences de vectorisation sont produits par les souches d'expression, et s'il est possible, le cas échéant, de les purifier efficacement. Les facteurs de transcription non couplés ont dans un premier temps été utilisés afin de déterminer la meilleure méthode de production et de purification, qui servira de bases aux différentes protéines fusion. Seuls Oct4 et Sox2 ont été utilisés pour les expériences de mises au point, étant donné qu'ils constituent le noyau central de tous les protocoles de reprogrammation et qu'il a été montré que ces deux facteurs étaient suffisants pour induire la reprogrammation de cellules somatiques en iPS, et ce même avec un vecteur non intégratif (Meng *et al.*, 2012). Les facteurs natifs serviront également de référence afin d'évaluer l'influence des séquences de vectorisation sur leur affinité pour leur séquence d'ADN cible.

i. Détermination des conditions de production optimales par *E. coli*

Nous avons dans un premier temps réalisé des tests d'expression afin de vérifier que les différentes constructions étaient bien produites par les souches d'expression, et avons aussi

cherché à optimiser les conditions de production afin d'obtenir des rendements de protéines solubles les meilleurs possibles. Pour cela, nous avons fait varier différents paramètres : la température d'induction, la DO d'induction, la concentration en IPTG ainsi que la composition du milieu de culture.

Premièrement, nous avons déterminé la température optimale de production des facteurs seuls. Nous avons d'abord comparé les niveaux de production et les différences de solubilité aux deux températures les plus utilisées en production par *E. coli* : 37°C, permettant une surexpression de la protéine pendant un temps court (3h) et 16°C pendant 15h, température à laquelle la production est ralentie mais favorisant le repliement et ainsi la solubilité, mais aussi à une température intermédiaire de 25°C pendant 15h.

Nous avons déterminé que 16°C et 25°C étaient les températures optimales de production pour Oct4 et Sox2, respectivement :

- Oct4 précipite totalement à 37°C (Figure 25A) et la quantité de protéine soluble est plus importante à 16°C qu'à 25°C (Figure 25B).
- Sox2 est exprimée aux trois températures, mais un phénomène de dégradation important est observé à 37°C (données non montrées) alors que la production est légèrement meilleure à 25°C qu'à 16°C (Figure 25B).

Nous avons également vérifié si le milieu de culture avait une influence sur la production des deux facteurs. Pour cela nous avons comparé les milieux LB et "Terrific Broth" (milieu enrichi permettant d'atteindre une densité cellulaire plus importante) pour la production d'Oct4 et Sox2 à leur température optimale. Alors que la production en "Terrific Broth" conduit à une dégradation importante d'Oct4 (données non montrées), ce milieu de culture permet d'obtenir une quantité plus importante de Sox2 par rapport à une production en milieu LB, dans des conditions équivalentes (Figure 25C). Nous avons donc conservé le milieu LB pour la production d'Oct4 et décidé d'utiliser le milieu "Terrific Broth" pour la production de Sox2.

Enfin, nous avons analysé l'influence de la concentration en IPTG ainsi que la DO_{600nm} à laquelle est induite l'expression. Nous avons réalisé une gamme de concentration d'IPTG, de 0,1 mM à 1 mM et avons induit la production à des DO_{600nm} de 0,6 et 0,8. Nous n'avons néanmoins observé aucune influence significative de ces deux paramètres et avons donc

décidé de poursuivre avec les conditions utilisées habituellement, à savoir une concentration finale en IPTG de 0,5 mM et une DO d'induction de 0,8.

Ces différents essais nous ont permis de définir des conditions optimales pour la production d'Oct4 et Sox2 non couplés, qui ont également été appliquées avec succès à la production des deux facteurs de transcription associés aux domaines de vectorisation MD11 ou WW3. En revanche, des problèmes de biologie moléculaire, ajoutés à des contraintes de temps dans l'avancement du projet, ne nous ont pas permis de produire la protéine WW3-Sox2 dans les temps impartis.

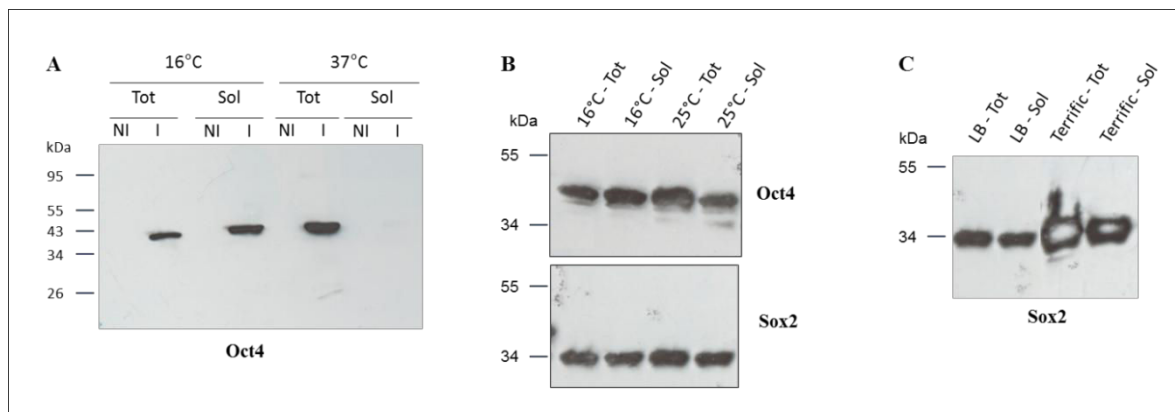


Figure 25. Optimisation de l'expression des facteurs de transcription en système *E. coli*. L'expression des protéines est réalisée dans 2 ml de milieu LB (Lysogeny Broth) ou Terrific (Terrific Broth) après induction (I) par ajout d'IPTG à une concentration finale de 0,5 mM à une DO_{600nm} initiale de 0,8. Des contrôles sans induction (NI) sont réalisés. Les bactéries subissent une lyse chimique et une fraction soluble (Sol) est isolée à partir du lysat total (Tot) par centrifugation. Ces résultats sont obtenus après migration des échantillons sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturante et réductrice, suivie d'un western blot grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-H6, couplé à la HRP. (A) Différences d'expression et de solubilité d'Oct4 lors de productions à 16°C et 37°C. (B) Expressions différentielles d'Oct4 et Sox2 à 16°C et 25°C. (C) Analyse de l'influence du milieu de culture sur la production de Sox2 à 25°C.

ii. Purification des facteurs de transcription non couplés

De nombreuses méthodes de purification ont été mises en œuvre, basées sur des chromatographies d'affinité sur résine de nickel, des échanges d'anion (Q-HP), des échanges de cations (SP-HP) mais aussi des résines d'affinité non spécifique (héparine). Différentes combinaisons ont d'ailleurs été utilisées, selon les propriétés physicochimiques des protéines, en faisant varier des paramètres tels que le pH, la force ionique, le temps de chargement, mais sans succès. En effet, ces différentes

méthodes n'ont permis d'obtenir que des quantités relativement faibles de protéines avec des niveaux de pureté non satisfaisants (données non présentées).

Finalement, c'est un protocole utilisé par Thier et ses collaborateurs (Thier *et al.*, 2012) qui a été retenu. Ce protocole repose sur une chromatographie d'affinité entre le tag poly-histidine et une résine de nickel, que nous avons déjà mise en œuvre, mais diffère par le fait que la résine est directement mélangée au lysat, puis le mélange est co-incubé sous agitation pendant 1h avant d'être transféré sur une colonne de chromatographie. Ce "batch" semble favoriser l'interaction entre la résine et le tag poly-histidines (H6), qui peut être masqué par le repliement des facteurs. Les résultats obtenus dans les conditions définies comme optimales sont présentés en Figure 26.

Nous pouvons voir que globalement, les profils de purification pour les deux facteurs sont similaires. Les lavages permettent de se débarrasser efficacement de nombreux contaminants bactériens avec une perte modérée pour Oct4, et un peu plus conséquente pour Sox2. Les profils d'élution sont également similaires avec des protéines d'intérêt retrouvées principalement dans les fractions 2 et 3. Nous notons néanmoins une moins bonne fixation de Sox2 à la résine puisque nous retrouvons une quantité non négligeable de la protéine dans le Flow Through (FT), au contraire d'Oct4 qui s'accroche quasiment en totalité. Ainsi, nous obtenons au final une quantité d'Oct4 bien supérieure à Sox2 à partir d'un même volume de culture. Ceci peut également s'expliquer par la différence d'expression entre les deux protéines.

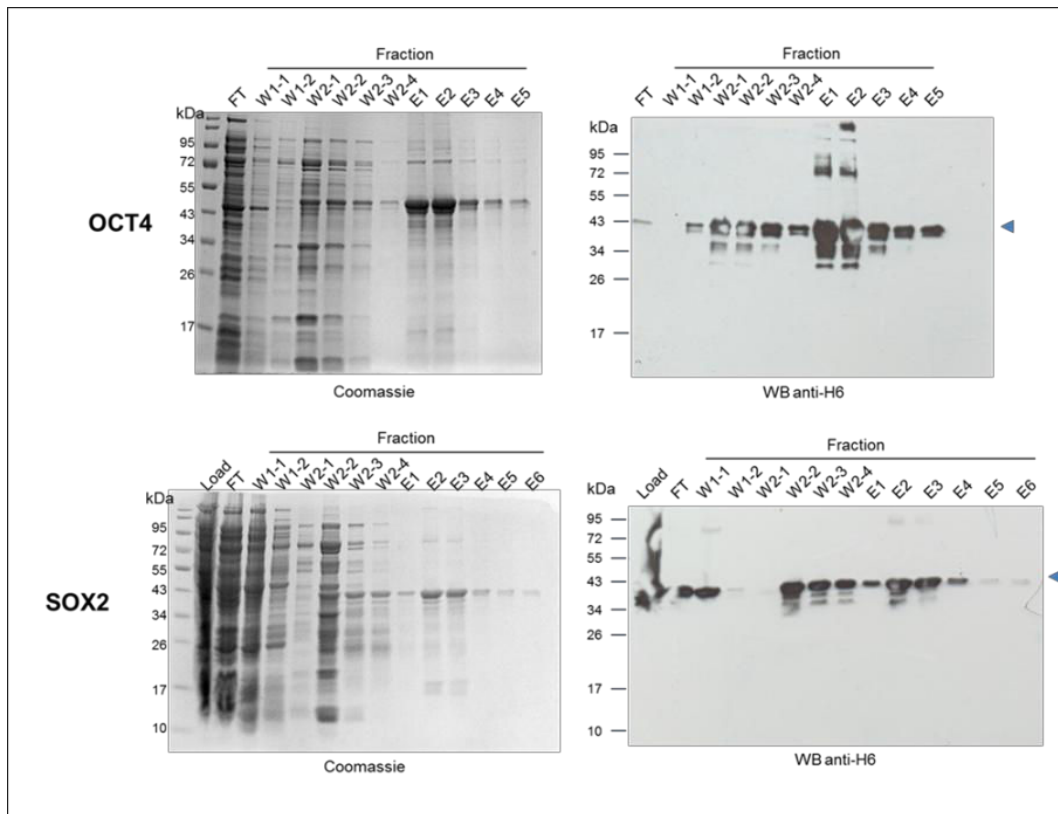


Figure 26. Purification par chromatographie d'affinité des facteurs Oct4 et Sox2. Après co-incubation du lysat bactérien soluble (Load) avec la résine Ni-NTA Agarose (Qiagen) pendant 1h, le mélange est transféré sur une colonne de chromatographie. Les protéines ne s'accrochant pas à la résine sont récupérées (Flow Through, FT). Après deux lavages par 2 X 1ml de tampon de lyse (W1-1,2) et 4 X 1ml de tampon de lavage (W2-1,2,3,4), les protéines sont éluées par 6 X 500 µl de tampon d'éluant contenant 500 mM d'imidazole (E1,2,3,4,5). Ces résultats sont obtenus après migration des échantillons sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturante et réductrice, suivie d'une coloration au bleu de Coomassie et d'un western blot grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-H6, couplé à la HRP.

iii. Purification des facteurs de transcription couplés au domaine minimal MD11 de la protéine Zebra et au domaine WW3 de l'ubiquitine-ligase Nedd4

Les séquences des facteurs de transcription ont été clonées en 3' des séquences codant pour MD11 ou WW3, au sein du plasmide pET15b et les protéines surexprimées en système *E. coli*.

Les profils de purification des deux facteurs de transcription couplés aux deux domaines MD11 et WW3, selon le protocole utilisé avec les facteurs non couplés, sont présentés en Figure 27.

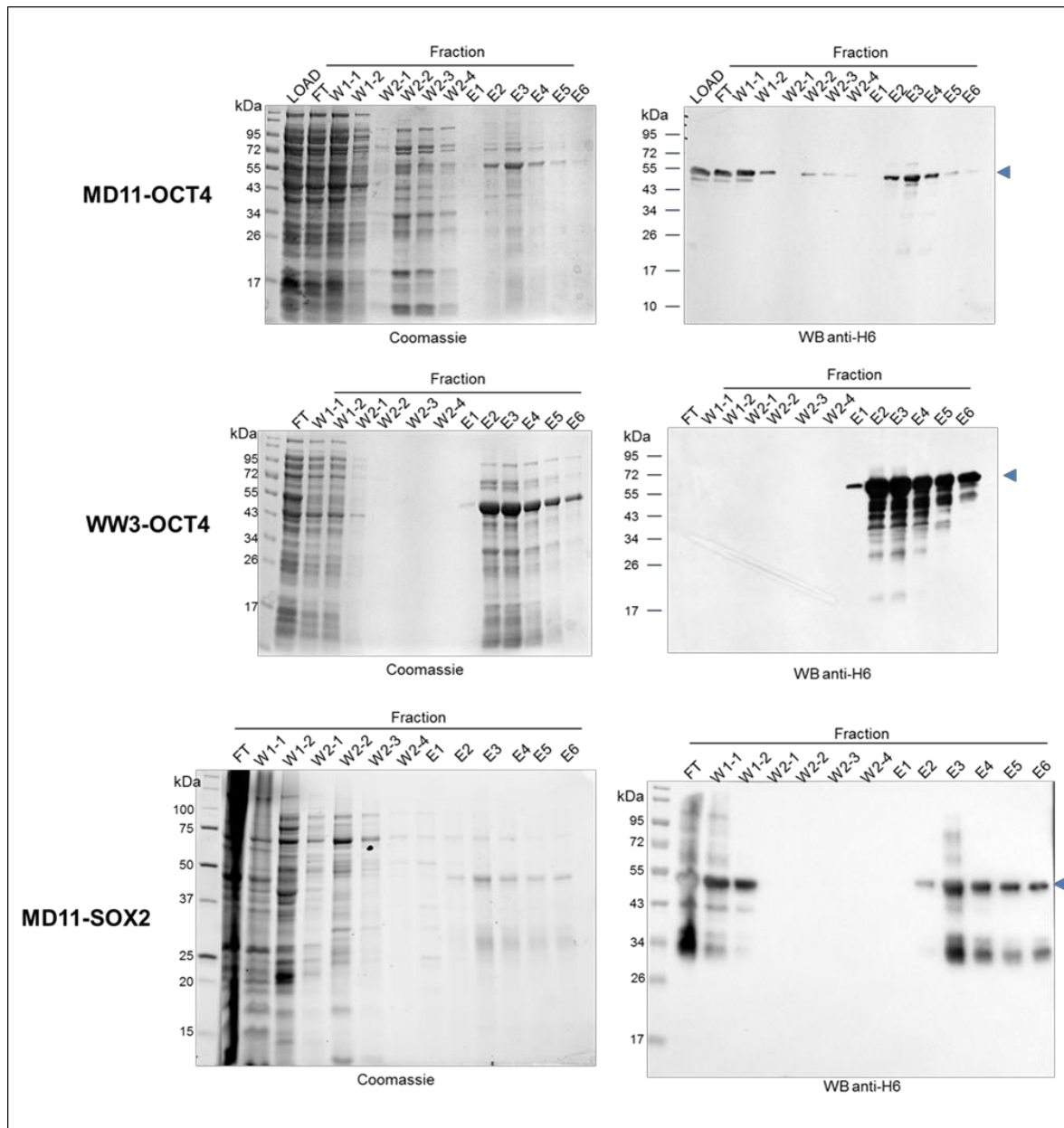


Figure 27. Purification par chromatographie d'affinité des facteurs Oct4 couplé à MD11 et WW3 et Sox2 couplé à MD11. Le protocole et les méthodes d'analyse sont les mêmes que pour la purification des facteurs non couplés.

Avec MD11, nous remarquons que les rendements de purification sont nettement moins bons qu'avec les facteurs non couplés. En effet une quantité importante de MD11-Oct4 et MD11-Sox2 est perdue dans le FT ainsi que dans les premières fractions de lavage. Ceci peut sans doute s'expliquer par la composition riche en acides aminés basiques de MD11, procurant aux constructions un pI très élevé. Le pH auquel nous travaillons 7.8, n'est peut-être pas adapté, étant donné que toutes les constructions avec MD11 ont un pI supérieur à

ce pH, conférant une charge globale positive à la protéine, potentiellement néfaste pour l'interaction avec les billes de nickel, également chargées positivement.

Pour ce qui est de la purification de WW3-Oct4, nous obtenons un profil très intéressant avec aucune perte de protéines détectable, ni dans le FT, ni lors des lavages. Les rendements de purification sont donc très bons, d'autant plus que la protéine est fortement exprimée par la bactérie. En revanche nous observons une dégradation importante de la protéine. Cependant, au vu du profil de migration, les produits de dégradation détectés ont un poids moléculaire relativement proche de la protéine intacte, et en prenant en compte le fait que le tag H6 est positionné dans la partie N-terminale de la construction, la dégradation semble intervenir dans la partie C-terminale d'Oct4. Si l'on compare le profil d'élution de la protéine non couplée, on observe également de la protéolyse.

Au final, nous avons réussi à travers un même protocole à purifier une grande majorité des facteurs de transcription Oct4 et Sox2 fusionnés ou non. Bien que les protéines obtenues au final ne soient pas parfaitement pures, les niveaux de pureté sont comparables entre les différentes constructions et jugés suffisants pour que ces protéines soient utilisées lors des expérimentations suivantes de caractérisation fonctionnelle. Ce protocole demande néanmoins à être optimisé, notamment en augmentant le pH auquel est réalisée la purification des constructions comportant MD11, mais aussi pour Sox2, car cette protéine présente naturellement un pI très élevé, proche de 10.

A l'issue de ces mises au point, nous sommes en mesure de produire Oct4 et Sox2 associés aux séquences MD11 et WW3, avec des niveaux de pureté satisfaisants, permettant ainsi d'envisager d'utiliser le peptide de transduction MD11 ainsi que le Dd de l'Ad3 pour la reprogrammation de cellules somatiques.

4. Production et translocation par le SST3 de *Pseudomonas aeruginosa*

Le SST3 de *P. aeruginosa* présente l'avantage de faire produire par la bactérie puis d'injecter différents types de protéines directement dans le cytoplasme des cellules, permettant ainsi de s'affranchir de toute étape de purification. Le seul obstacle potentiel est la capacité de la protéine d'intérêt à être transportée via le translocon de l'appareil de

sécrétion. En effet, il a été montré au laboratoire que certains paramètres tels que la taille ou l'hydrophobicité constituaient des freins au transport, notamment avec des protéines de taille importante (plus de 80 kDa) ou très hydrophobes, comme la GFP.

Afin d'envisager de réaliser une reprogrammation avec le SST3 de *P. aeruginosa*, la première étape consiste à vérifier que les facteurs couplés au peptide de translocation ExoS54 sont bien capables d'être synthétisés puis transportés par l'injectisome. Pour cela, l'expression de la protéine est induite par ajout d'IPTG alors que la sécrétion est permise grâce à une déplétion calcique dans le milieu de culture. Les protéines présentes dans le surnageant de culture sont alors concentrées par précipitation et séparées par SDS-Page en conditions dénaturantes puis analysées par une coloration au bleu de Coomassie suivie d'un immunomarquage. Nous avons analysé la sécrétion des deux facteurs par les souches OST et OST- Δ uvrAB. Les résultats du test de sécrétion des facteurs Oct4 et Sox2 sont présentés en Figure 28.

Ces premiers résultats indiquent que les deux facteurs Oct4 et Sox2 sont transportés par le SST3, aussi bien par la souche OST que par la souche Δ uvrAB. La sécrétion de Sox2 est plus forte que celle d'Oct4, la différence pouvant être attribuée aux propriétés physicochimiques des deux protéines. En outre, la sécrétion par la souche OST semble plus importante que par la souche OST- Δ uvrAB, et ce pour les deux facteurs. Pour Sox2, une bande avec un poids moléculaire plus important, entre 95 et 130 kDa est observée, il s'agit vraisemblablement d'un dimère de la protéine, artefact du SDS-Page fréquemment rencontré lors de l'analyse de protéines recombinantes.

Ainsi le SST3 de *P. aeruginosa* se présente également comme un vecteur candidat pour le développement d'un protocole de reprogrammation cellulaire, étant donné que les deux facteurs de transcription testés sont transportés efficacement via l'injectisome, et ce de manière extrêmement rapide et facile à mettre en œuvre. De plus, le SST3 de la souche OST- Δ uvrAB est également capable de transporter les facteurs de reprogrammation Oct4 et Sox2. Ainsi, il est envisageable d'appliquer le traitement photochimique atténuateur KBMA pour nos futures expériences réalisées avec ce vecteur, prévenant la réplication de la bactérie, ce qui apporte une sécurisation intéressante au vecteur.

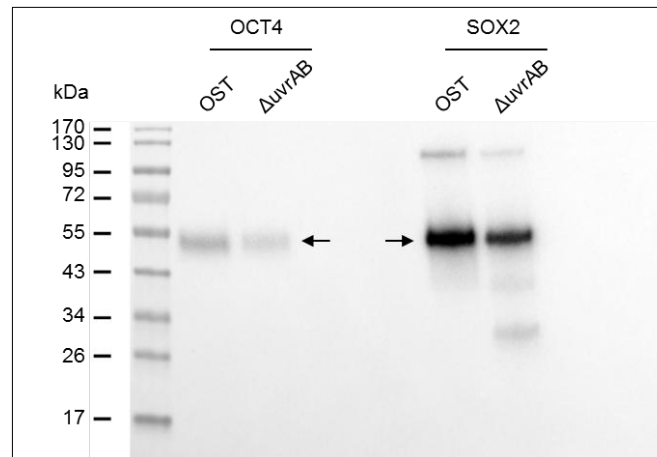


Figure 28. Test de sécrétion des facteurs Oct4 et Sox2 par le SST3. Les souches OST et Δ uvrAB ont été testées pour la sécrétion de ces deux facteurs. Les protéines d'intérêt, indiquées par une flèche, sont détectées grâce à l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le tag poly-histidines, couplé à la HRP. La révélation est réalisée par chimiluminescence. Une quantité équivalente de protéines totales a été déposée dans chaque puits (20 μ g). Tailles attendues : ExoS54-OCT4 : 45,5 kDa, ExoS54-SOX2 : 40,9 kDa.

Au final, nous sommes parvenus, à l'issue de nombreuses optimisations, à produire et, le cas échéant, purifier efficacement les facteurs de transcription Oct4 et Sox2, couplés aux différentes séquences de vectorisation, ExoS54, MD11 et WW3 (à l'exception de WW3-Sox2 comme mentionné précédemment).

II. Analyse de l'influence des séquences de vectorisation sur l'affinité des facteurs de transcription pour leur séquence cible

Les facteurs de transcription possèdent des structures et des domaines leur conférant une conformation bien particulière à l'origine de leur fonction. Parmi ces domaines on retrouve notamment le domaine de fixation à l'ADN, le domaine d'activation de la transcription mais aussi le domaine de dimérisation ou d'association à d'autres facteurs de transcription, comme ce qui est par exemple observé entre Oct4 et Sox2, formant un hétérotrimère avec la séquence d'ADN cible (Botquin *et al.*, 1998 ; Nishimoto *et al.*, 1999 ; Yuan *et al.*, 1995). C'est pourquoi, il est très important de vérifier que l'ajout des différentes séquences de vectorisation, à savoir ExoS54, MD11 et WW3, ne perturbe pas la fixation à la séquence d'ADN cible du facteur de transcription couplé.

Pour ce faire, nous avons décidé de comparer l'influence des différentes séquences ajoutées sur Oct4. Oct4 est un facteur de transcription à homéodomaine se fixant au niveau des promoteurs via l'interaction avec deux motifs palindromiques séparés par 5 paires de base : ATGCAAAT (Botquin *et al.*, 1998). Un kit commercial basé sur la technique du test ELISA a été utilisé (Active Motif TransAM® Oct-4) (Figure 29). Ce test repose sur l'utilisation d'une séquence d'ADN cible contenant le motif consensus reconnu par Oct4, afin d'évaluer l'affinité relative des différentes constructions pour cette séquence.

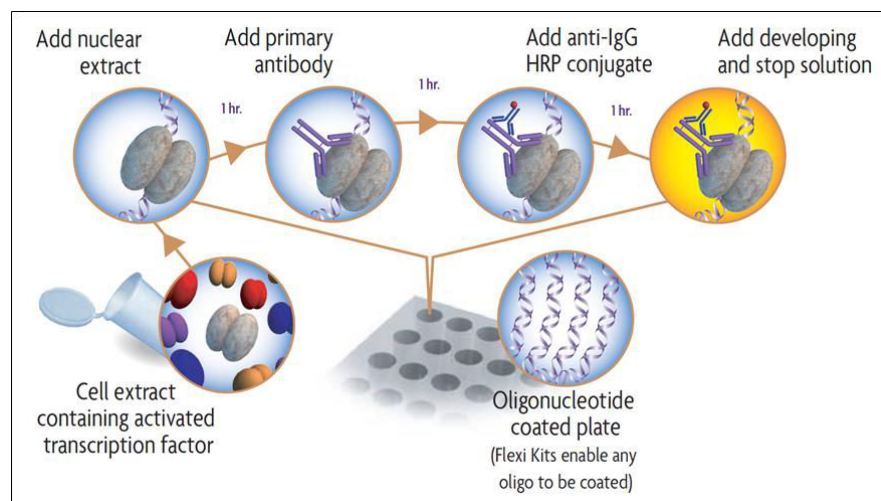


Figure 29. Principe du kit Active Motif TransAM® Oct-4. La séquence cible du facteur de transcription est immobilisée au fond des puits d'une plaque 96 puits. Un anticorps primaire dirigé contre Oct4 puis un anticorps secondaire couplé à la HRP permettent de marquer les protéines cibles fixées à l'ADN. Un substrat chromogène de la HRP est utilisé, le produit généré absorbant à 450 nm (coloration bleue), l'absorbance obtenue est proportionnelle à la quantité de protéines associées à la séquence d'ADN immobilisée. Une gamme d'extrait nucléaire contenant Oct4, obtenu à partir de cellules P19 (lignée murine dérivée d'un carcinome embryonnaire) permet de corréler l'absorbance obtenue à un équivalent d'extrait nucléaire, exprimée en µg/ml, et ainsi de réaliser une comparaison semi-quantitative entre les différentes constructions. La gamme de détection s'étend entre 0,5 et 5 µg d'extrait nucléaire par puits.

Les résultats obtenus avec les différentes protéines couplées ou non à nos vecteurs, en comparaison de la séquence poly-arginines faisant référence dans la bibliographie, sont présentés en Figure 30. L'augmentation d'absorbance en fonction de la concentration en protéines atteint une valeur limite de 1,76 pour Oct4 seul, 1,55 avec ExoS54, 1,35 avec MD11 et 1,26 avec WW3, pour une concentration de 0,25 µg/ml. Nous observons néanmoins que l'absorbance limite est quasiment atteinte dès 0,05 µg/ml de protéines avec la séquence ExoS54, contre une absorbance de 1,19 pour Oct4 seul à cette même

concentration, suggérant une affinité supérieure de la construction ExoS54-Oct4 à faible concentration. Au contraire, les valeurs d'absorbance obtenues avec le domaine poly-arginines (Arg_{x9}-Oct4) sont de manière générale plus faibles que celles obtenues avec nos différentes séquences, et ce à concentration égale. En effet, une absorbance de 1,32 est obtenue à une concentration de 2,5 µg/ml de R9-Oct4, soit une concentration 10 fois plus importante que pour les constructions MD11-Oct4 WW3-Oct4. Ces données indiquent que le domaine poly-arginines perturbe la fixation d'Oct4 à sa séquence cible. Ce phénomène est peut être lié à la charge électrique de cette séquence composée d'acides aminés basiques. Au contraire, ExoS54 est plutôt acide avec un point isoélectrique de 6. De manière encore plus significative, les valeurs d'absorbance obtenues avec l'extrait nucléaire contenant Oct4, sont à concentration équivalente en protéines totales, beaucoup plus faible. Ceci peut être associé au fait qu'Oct4 est fortement dilué au sein de l'extrait nucléaire.

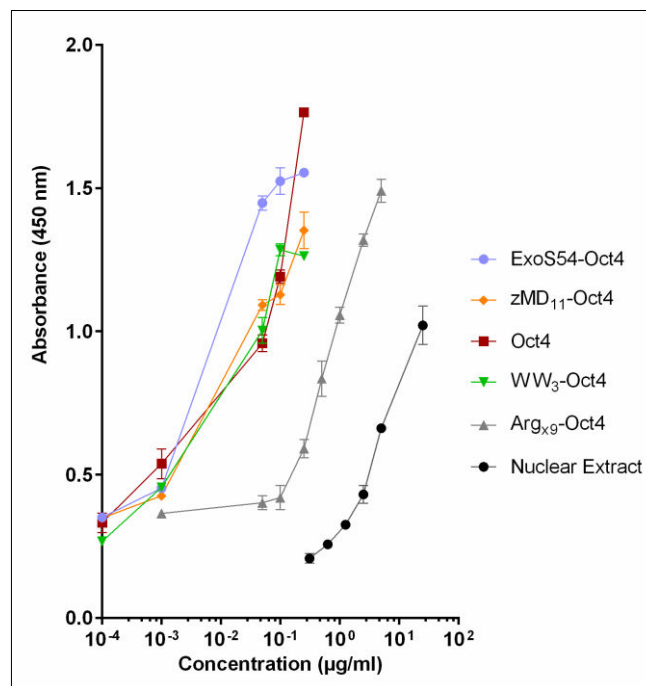


Figure 30. Influence des séquences de vectorisation sur l'affinité d'Oct4 pour sa séquence d'ADN cible. Les différentes constructions ont été produites en système *E. coli* et purifiées par affinité sur une résine de nickel. Différentes quantités de protéines recombinantes purifiées ont été utilisées en parallèle de la gamme d'extrait nucléaire afin de relier la concentration à l'affinité. ExoS54-Oct4 : Oct4 fusionné aux 54 premiers acides aminés de l'exotoxine S (bleu) ; zMD11-Oct4 : Oct4 couplé au domaine minimal MD11 de la protéine Zebra (orange) ; Oct4 : Oct4 seul, non couplé (rouge) ; WW3-Oct4 : Oct4 couplé au domaine WW3 de la protéine Nedd4 (vert). Arg_{x9}-Oct4 : Oct4 couplé au domaine poly-arginines (gris) ; Nuclear extract : extrait nucléaire de cellules embryonnaires murines P19 (noir).

Ces données démontrent que les vecteurs développés par l'équipe TheREx sont tout à fait pertinents pour des applications de reprogrammation cellulaire puisqu'en termes de fonctionnalité, les différentes séquences de vectorisation associées, à savoir ExoS54, WW3 et MD11, ne modifient en rien la fixation d'Oct4 à sa séquence d'ADN cible. Au contraire, la présence de la séquence ExoS54, semble, à faible concentration (jusqu'à 0,1 µg/ml), améliorer la fixation du facteur à sa cible. En revanche, le domaine poly-arginines, déjà utilisé pour la génération d'iPS à partir de cellules humaines, réduit considérablement l'affinité du facteur pour la séquence consensus. Nous pouvons ainsi supposer, qu'à efficacité de vectorisation équivalente, les vecteurs que nous proposons permettent d'induire une activation transcriptionnelle plus forte au niveau des gènes cibles, et ainsi d'obtenir une efficacité de reprogrammation supérieure. L'influence de ces séquences sur les autres facteurs de transcriptions envisagés pour la reprogrammation n'a en revanche pas pu être évaluée.

III. Comparaison des efficacités de transport dans les cellules cibles des différents vecteurs

1. La bêta-lactamase et la GFP comme outils de comparaison

Afin de comparer les efficacités de vectorisation des différents vecteurs, ainsi que de pouvoir optimiser les conditions expérimentales d'utilisation pour chacun d'entre eux, deux protéines rapportrices ont été sélectionnées : la GFP, utilisée couramment dans de nombreuses études, et la bêta-lactamase de type TEM (Bla). La GFP possède l'avantage d'être un véritable standard, largement utilisée mais aussi décriée comme générant un bruit de fond important lié à une interaction non spécifique avec la membrane plasmique. L'utilisation de Bla, en revanche présente une méthode de détection beaucoup plus spécifique, grâce à l'utilisation d'un substrat fluorigène, le CCF2-AM, qui permet d'éliminer tout bruit de fond. Comme présenté en Figure 31, le substrat est hydrolysé à son entrée dans la cellule eucaryote et ne peut plus en ressortir. De plus Bla ne peut cliver le substrat que lorsqu'il est dans sa forme estérifiée, ce qui apporte un deuxième niveau de contrôle.

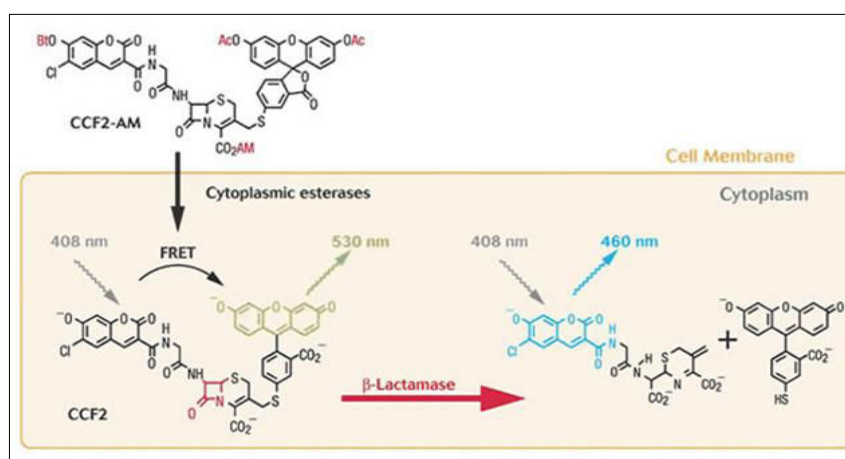


Figure 31. Principe du CCF2-AM pour la détection de l'activité bêta-lactamase. Le substrat CCF2-AM, entre dans les cellules eucaryotes dans lesquelles il est hydrolysé. Cette modification lui confère des propriétés de transfert d'énergie de fluorescence (FRET) entre la molécule de coumarine et la molécule de fluorescéine qui le composent. Lors d'une excitation à 408 nm, une émission à 530 nm liée au substrat est observée. En présence de bêta-lactamase, la molécule est clivée au niveau du noyau bêta-lactame et le FRET n'est plus possible. Une émission du produit à 460 nm est alors observée sous une même excitation à 408 nm.

2. Efficacité de transport par le SST3 de *P. aeruginosa*

i. Translocation d'ExoS54-Bla via le SST3

Comme indiqué précédemment, la première étape nécessaire est de vérifier que Bla peut être sécrétée par le SST3. Pour cela, un test de sécrétion de l'enzyme a été réalisé avec la souche OST (Figure 32). Le résultat du Western Blot nous indique qu'ExoS54-Bla est bien sécrétée par le SST3 de cette souche. Pour ce qui est de la souche Δ uvrAB, des travaux précédent de l'équipe TheREx ont décrit l'utilisation de ExoS54-Bla pour vérifier la capacité de la souche Δ uvrAB, avec et sans traitement photochimique KBMA, à injecter des cellules de la lignée HL60 (Le Gouëllec *et al.*, 2013), ce qui montre que Bla est également vectorisée par cette souche.

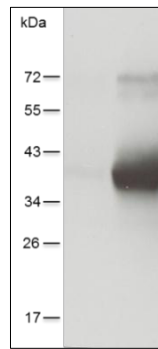


Figure 32. Test de sécrétion de la bêta-lactamase par la souche OST. La protéine est détectée dans le surnageant de culture grâce à l'utilisation d'un anticorps primaire de lapin dirigée contre Bla et d'un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à la HRP, suivi d'une révélation par chimiluminescence ; taille attendue ExoS54-BLA : 35,6 kDa.

ii. Preuve de concept de la vectorisation intracellulaire *in vitro* d'ExoS54-Bla via le SST3

Le test de sécrétion nous a permis de vérifier que Bla pouvait être transportée via la SST3 mais ne nous indique en aucun cas si la protéine peut être vectorisée jusqu'au cytosol des cellules cibles. Nous avons donc cherché à vérifier que notre vecteur était capable d'injecter dans différents types cellulaires, et notamment dans les types cellulaires d'intérêt que sont les CD34⁺ de sang de cordon et les fibroblastes. Une première expérience a été réalisée sur la lignée K562 (progéniteur érythroblastique), dont les propriétés sont comparables à celles des cellules comparables à celles des CD34⁺, du moins en termes de morphologie (petites, rondes et non adhérentes). Les cellules ont été mises en contact de différentes quantités de bactéries dans lesquelles l'expression de la protéine a été induite préalablement à l'injection. Le contact avec la cellule cible est alors l'élément déclencheur de l'assemblage et de l'activation du SST3 et de l'injection qui suit la présentation de la séquence d'adressage au SST3 (Frank, 1997 ; Vallis *et al.*, 1999). L'efficacité d'injection est évaluée par cytométrie en flux grâce à l'utilisation du substrat fluorigène de Bla, le CCF2. Les résultats sont présentés en Figure 33.

L'injection d'ExoS54-Bla est corrélée à une augmentation de l'hydrolyse du substrat, caractérisée par une augmentation du signal fluorescent (MFI) à 447 nm, d'autant plus importante que le ratio bactéries : cellules est élevé, avec plus de 20 000 pour la multiplicité d'infection (MOI) 5 contre plus de 30 000 pour la MOI 50. Le nombre de cellules injectées est lui aussi d'autant plus important que la MOI est élevée, avec environ

25% de cellules injectées à MOI 5 contre presque 40% à MOI 50. Cette augmentation de l'hydrolyse du substrat est bien spécifique de l'injection de Bla, étant donné que seul un bruit de fond très réduit est observé avec la souche injectant ExoS54-Ova de même qu'avec la souche OST-BD sécrétant mais n'injectant pas ExoS54-Bla. En outre, dans ces contrôles, la MFI, très certainement proche du bruit de fond, ne varie pas ou très peu en fonction de la MOI. De même, la présence d'un inhibiteur spécifique de l'enzyme (acide clavulanique) réduit considérablement l'intensité de fluorescence du produit, confirmant la aussi que la fluorescence observée est liée principalement à l'activité de ExoS54-Bla.

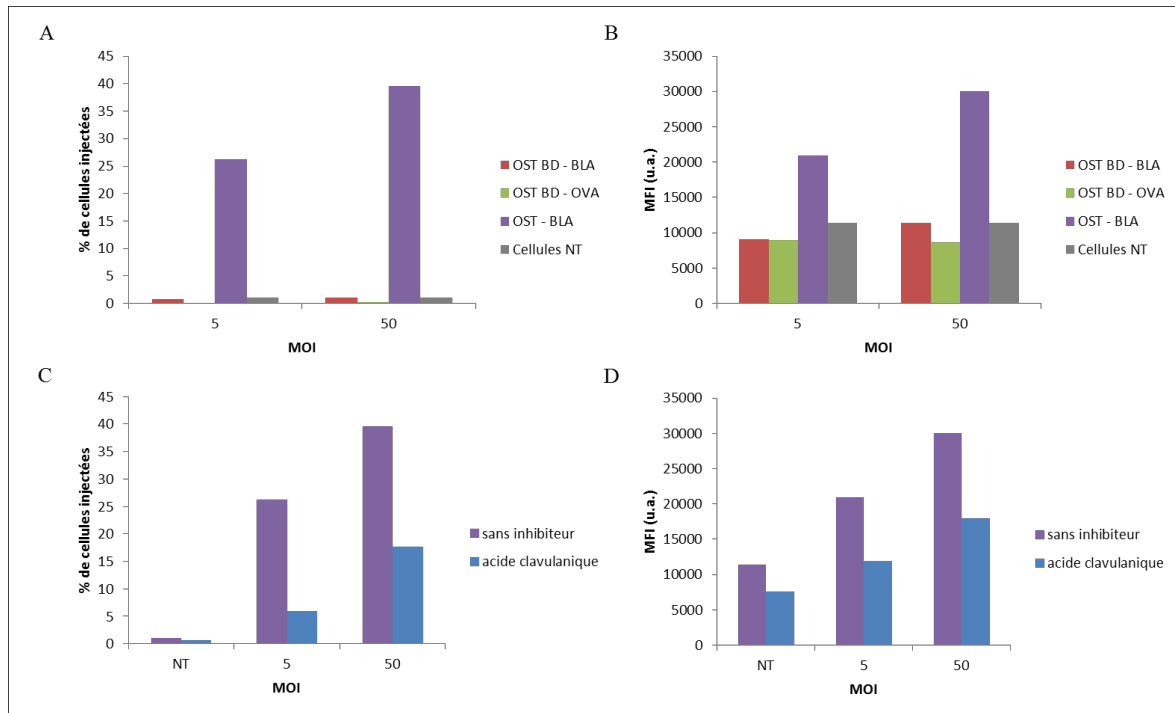


Figure 33. Injection d'ExoS54-Bla par le SST3 dans la lignée K562. La co-incubation bactéries/cellules est réalisée en plaque 96 puits où les cellules ont été réparties à 100 000 cellules par puits, 3h avant l'injection. Les cellules sont transférées dans des tubes à cytométrie pour l'analyse, 3h après injection. Les résultats présentés indiquent le pourcentage de cellules injectées pour chaque condition ainsi que l'intensité d'injection, représentant le nombre de molécules de CCF2 hydrolysées et donc proportionnelle à la quantité d'enzyme injectée, exprimée en intensité moyenne de fluorescence (MFI, u.a.), en fonction du ratio bactéries : cellule ou multiplicité d'infection (MOI), ici 5 et 50. Une souche injectant Ova (OST ExoS54-Ova) et une autre dépourvue d'un SST3 fonctionnel (OST-BD ExoS54-Bla) (A et B) ainsi qu'un inhibiteur de la Bla, l'acide clavulanique (C et D), sont utilisés comme contrôle.

Ces résultats ont pu être confirmés grâce à une analyse par microscopie en fluorescence, où la lignée K562 a été mise en contact de la souche OST ExoS54-Bla à MOI croissante (Figure 34).

La quantité de cellules fluorescentes augmente considérablement en fonction de la MOI. En revanche aucun signal positif n'a pu être observé avec l'injection d'ExoS54-Ova à MOI 200 (données non présentées). Ces données démontrent qu'ExoS54-Bla est bien injectée et fonctionnelle *in vitro*, et donc utilisable comme système rapporteur permettant d'évaluer le SST3 comme vecteur de reprogrammation, en terme d'efficacité de vectorisation.

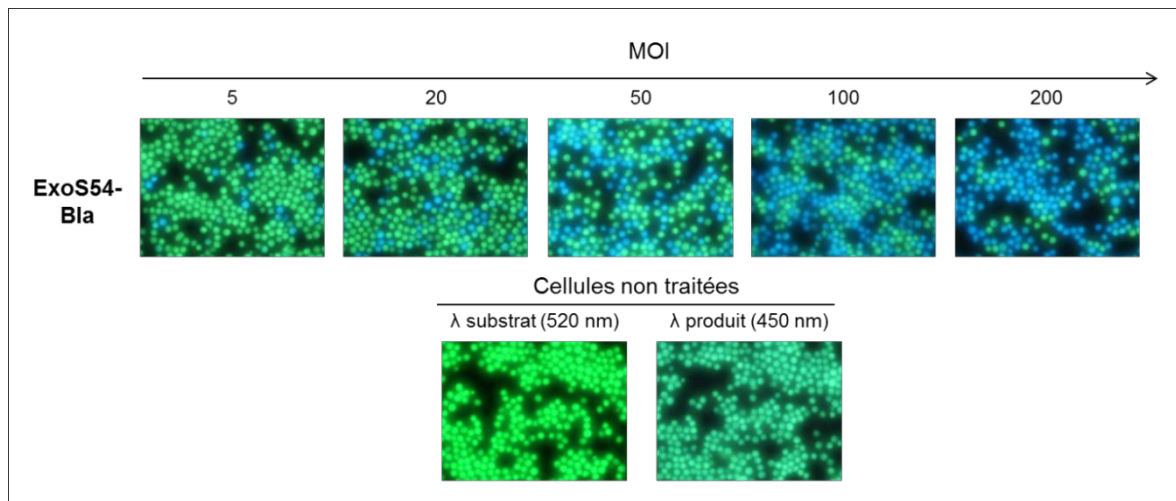


Figure 34. Analyse visuelle de l'injection d'ExoS54-Bla dans la lignée K562 par microscopie en fluorescence. La co-incubation bactéries/cellules est réalisée pendant 1h en plaque 96 puits où les cellules ont été réparties à 100 000 cellules par puits, 3h avant l'injection. Les observations sont réalisées 2h après injection et ajout du CCF2, à la longueur d'onde d'émission du produit, 450 nm. Les cellules vertes sont les cellules non injectées, les cellules bleues les cellules injectées, l'intensité du signal bleu étant proportionnelle à l'hydrolyse du substrat.

iii. Translocation de protéines d'intérêt par le SST3 au sein de CSH de sang de cordon et de fibroblastes

a. Injection de CSH CD34⁺ de sang de cordon

Nous avons ensuite cherché à vérifier que le SST3 était capable d'injecter des protéines d'intérêt au sein de cellules qui seront utilisées comme cellules sources pour les expériences de reprogrammation, à savoir les CD34⁺ de sang de cordon ombilical et les fibroblastes humains. L'injection a d'abord été vérifiée au sein de cellules CD34⁺. La construction ExoS54-Bla a de nouveau été utilisée afin de vérifier l'efficacité de vectorisation. Les cellules ont été mises en présence de différentes quantités de bactéries, puis les résultats analysés par cytométrie en flux (Figure 35A).

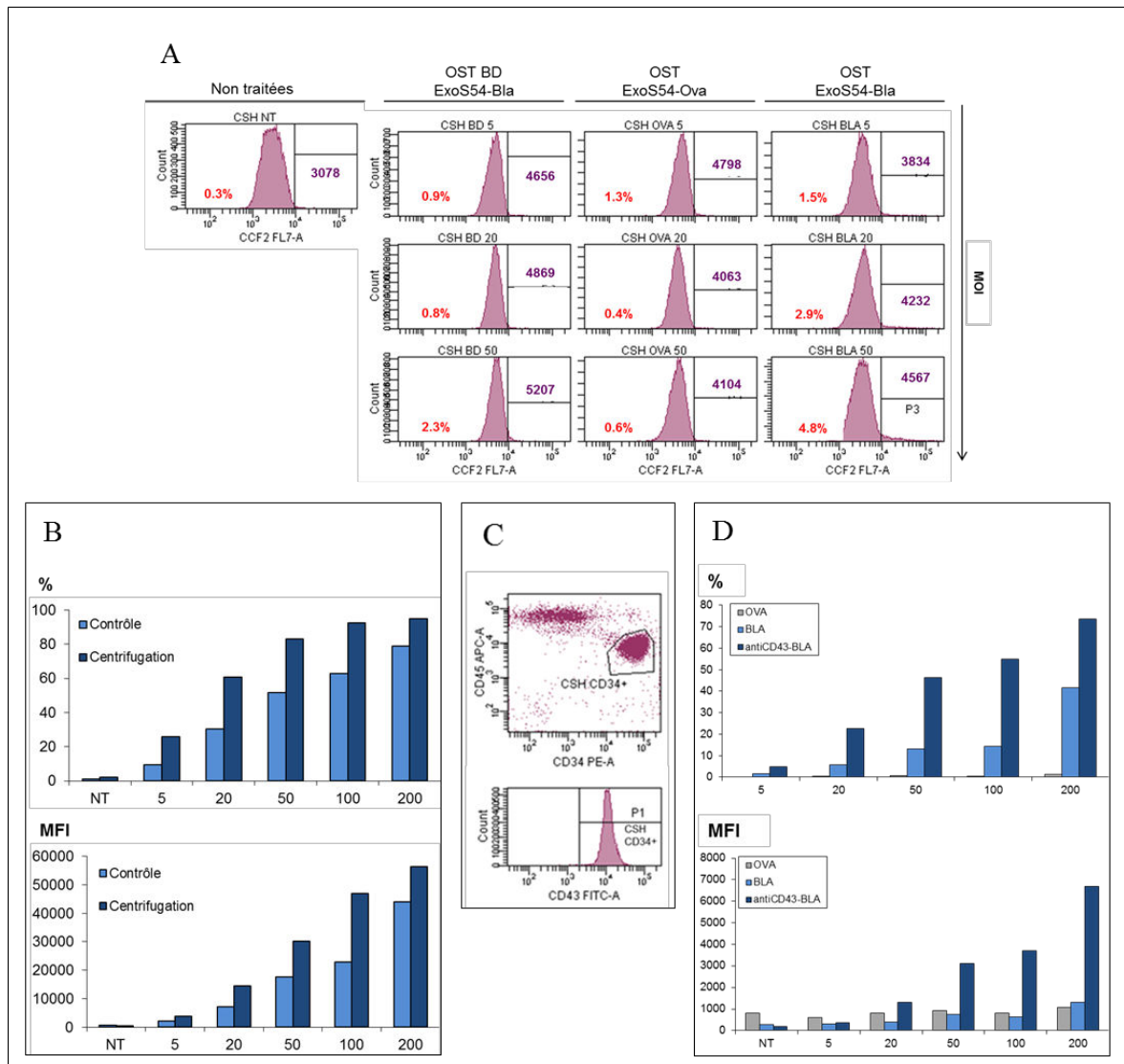


Figure 35. Optimisation des conditions de translocation de protéines via le SST3 dans les CD34⁺ de sang de cordon. Ces données ont été générées par des analyses de cytométrie en flux. ExoS54-Bla est utilisé comme témoin de translocation. Les injections sont réalisées pendant 1h et les analyses 2h après la fin de l'injection, après ajout du substrat CCF2. (A) Analyse de l'efficacité de translocation dans des CD34⁺, sans optimisation. Le pourcentage de cellules injectées est indiqué en rouge, les MFI en violet. (B) Apport de la centrifugation sur la translocation de ExoS54-Bla dans la lignée K562 par la souche OST. Une centrifugation de 10 min à 800 g est appliquée après ajout des bactéries aux cellules à différentes MOI. L'injection est réalisée en milieu RPMI sans sérum. (C) Vérification de la présence de la leucosialine (CD43) sur les CD34⁺ de sang de cordon. Une première sélection des cellules CD34⁺ est réalisée par un marquage à l'aide d'une IgG2a couplée PE (haut) puis la présence de CD43 est analysée sur cette population grâce à une IgG1 couplée FITC (bas). (D) Influence de l'immobilisation des cellules CD34⁺ par un "coating" anti-CD43 sur l'efficacité de vectorisation par le SST3. L'expérience est réalisée en milieu sans sérum.

Ces premiers résultats indiquent que la translocation de Bla dans des CD34⁺ de sang de cordon est extrêmement faible, à la fois en terme de cellules injectées et de nombres d'enzymes injectées par cellule.

b. Optimisation des conditions de translocation *in vitro*

Nous avons alors cherché à déterminer des paramètres favorisant l'injection des cellules par le SST3. Premièrement, nous avons estimé qu'une centrifugation de la co-culture bactéries/cellules cibles pouvait permettre d'améliorer l'injection de la protéine d'intérêt via le SST3 en favorisant le contact entre bactéries et cellules. Nous avons d'abord réalisé une centrifugation de la co-culture bactéries/cellules à 800 g pendant 10 min, afin d'essayer de plaquer les bactéries sur les cellules et ainsi de forcer l'injection. Ces paramètres de centrifugation ont été déterminés arbitrairement, en s'appuyant sur les protocoles de culture cellulaire utilisés en routine.

Les résultats, présentés en Figure 35B, indiquent clairement que la centrifugation améliore l'injection à la fois en termes de pourcentage de cellules injectées et quantités de protéines injectées dans les cellules. En termes de pourcentage, la centrifugation permet d'injecter entre 20 et 30% de cellules supplémentaires, selon la MOI. De même, la MFI est améliorée d'un facteur 1,5 à 2 selon la MOI grâce à la centrifugation, avec une différence un peu moins prononcée à MOI élevée.

En 2012, l'équipe de François Cretin a montré que l'immobilisation de cellules non adhérentes, normalement réfractaires à la translocation, telle que la lignée promyéloblastique HL-60, les rendait permissives à l'injection via le SST3 (Verove *et al.*, 2012). Les auteurs ont immobilisé les cellules sur les supports de culture grâce à deux méthodes : (i) l'utilisation d'un anticorps dirigé contre une glycoprotéine membranaire, la leucosialine (CD43), impliquée dans l'adhésion cellulaires (propriétés adhésives et anti-adhésives), la signalisation et l'interaction avec le cytosquelette (Ostberg *et al.*, 1998) ; (ii) l'absence de sérum dans le milieu de culture.

Nous avons donc cherché à vérifier si ces paramètres pouvaient nous permettre d'améliorer l'efficacité de vectorisation au sein de nos cellules cibles. Après avoir vérifié que les CSH de sang de cordon exprimaient bien CD43 (99% des cellules CD34⁺ sont aussi CD43⁺, Figure 35C), un test d'injection a été réalisé afin de déterminer l'influence de l'immobilisation de ces cellules sur la translocation via le SST3 (Figure 35D). Le pourcentage de cellules injectées mais aussi l'intensité moyenne de fluorescence de ces cellules est largement supérieure grâce au "coating" anti-CD43, en milieu sans sérum. Par exemple, à MOI 50, 46% des cellules sont injectées avec le "coating" contre 13% sans,

avec des MFI respectives de 3109 et 747 ; L'influence de cette immobilisation sur le pourcentage de cellules injectées est plus marquée à faible MOI tandis que les différences sur la quantité de protéines injectées sont plus prononcées à forte MOI. Notons qu'à MOI 200, presque 75% des cellules sont injectées avec une MFI de quasiment 7000, dans les conditions optimales, soit 30% de plus et avec une intensité cinq fois supérieure au contrôle sans "coating".

Nous avons ainsi réussi à optimiser les conditions de vectorisation de protéines d'intérêt au sein de cellules CD34⁺. Avec le protocole appliqué jusqu'à présent, nous ne pouvions qu'injecter à peine 5% des cellules avec une MOI de 50 ; à l'issue de ces étapes d'optimisation, le protocole d'injection permet de vectoriser une protéine d'intérêt dans presque 50% des cellules, soit une amélioration d'un facteur 10.

c. Injection de fibroblastes humains

Après avoir démontré et amélioré la vectorisation de protéines via le SST3 au sein de notre premier type cellulaire d'intérêt, l'objectif était ensuite de vérifier que la translocation était également possible au sein du second type cellulaire, à savoir les fibroblastes. Nous avons décidé d'utiliser la lignée BJ, correspondant à des fibroblastes dermiques humains de nouveau-né. Ce type de fibroblastes, relativement immatures, a déjà été utilisé avec succès pour générer des iPS grâce à des méthodes non intégratives basées sur un transfert de protéines (Khan *et al.*, 2013 ; Lee *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2012).

Les résultats de l'injection d'ExoS54-Bla par la souche OST, au sein de cette lignée, et dans les conditions déterminées comme optimales pour les CSH à l'exception du "coating" anti-CD43, sont présentés en Figure 36. Nous pouvons voir que le SST3 est très efficace pour la vectorisation de protéines dans ces fibroblastes. En effet, avec notre enzyme rapportrice, la MFI est déjà proche de 8000 à une MOI de 10 et atteint plus de 30 000 avec une MOI de 200, soit quasiment cinq fois plus que pour les CSH. De la même manière, plus de 30% des cellules sont déjà injectées à MOI 10 alors que plus de 90% des cellules sont injectées à MOI 100, soit environ 40% de plus que pour les CSH. En outre, nous observons un effet dose-dépendant avec la MOI. Ces résultats démontrent qu'en plus des CSH CD34⁺ de sang de cordon, le SST3 est également un vecteur très efficace pour l'injection de protéines d'intérêt au sein de fibroblastes BJ.

En résumé, le SST3 se présente comme un outil de premier choix pour la vectorisation de facteurs de transcription et la reprogrammation de cellules somatiques humaines. En effet, nous avons montré qu'il permettait la translocation efficace des facteurs Oct4 et Sox2, que la séquence ExoS54 ne perturbait en rien l'interaction des facteurs de transcription à leur séquence cible, et qu'il permettait d'injecter efficacement des protéines d'intérêt dans les deux types cellulaires choisis pour la reprogrammation.

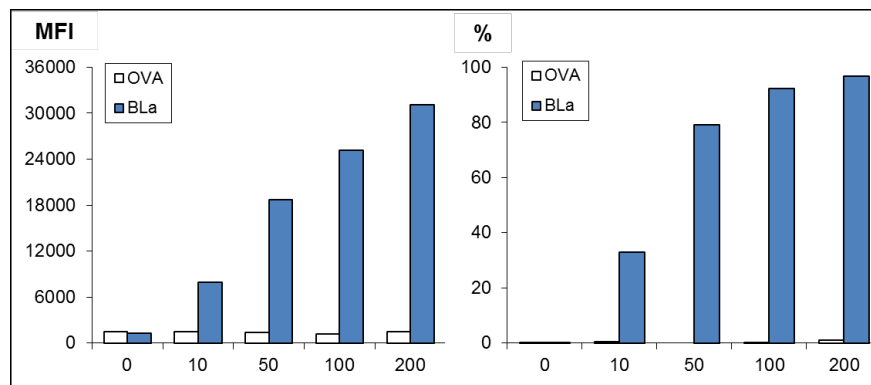


Figure 36. Analyse de l'injection d'ExoS54-Bla au sein de fibroblastes BJ par le SST3 de *P. aeruginosa*. Les cellules sont réparties à 50 000 cellules par puits en plaques 24 puits la veille de l'injection. L'injection est réalisée pendant 1h dans les conditions optimales, à savoir après une centrifugation de la co-culture pendant 10 min à 800 g, en l'absence de sérum. A l'issue de l'injection, le CCF2 est ajouté et l'analyse est réalisée après 2h d'incubation, après transfert des cellules en tubes de cytométrie. Un contrôle négatif est réalisé avec l'injection d'ExoS54-Ova (Ova).

3. Domaine minimal de transduction MD11 et domaine adaptateur WW3 pour l'interaction avec le Dd

i. Production et purification de Bla seule et associée aux séquences MD11 et WW3

Contrairement au SST3 pour lequel aucune étape de purification n'est nécessaire, les deux autres séquences vectrices demandent de déterminer des conditions de purification mais aussi de production en amont.

Bla est normalement une protéine périplasmique chez la bactérie tandis que la forme que nous utilisons ne possède pas la séquence d'adressage périplasmique et se concentre donc au niveau cytoplasmique. Il a été montré qu'une surexpression de l'enzyme chez *E.coli*

grâce à l'utilisation d'un promoteur inductible fort conduisait à la production d'une protéine insoluble, à l'origine d'agrégats (Georgiou *et al.*, 1994).

Il n'est donc pas étonnant d'observer beaucoup de précipitation lors de la production de l'enzyme seule et couplée aux domaines MD11 et WW3, à 37°C mais aussi à 16°C, et ce même en réduisant la concentration d'IPTG jusqu'à 0,05 mM (données non montrées).

Nous avons donc décidé de produire la protéine à 37°C pendant 3h et de travailler sur les corps d'inclusion. Les protéines sont solubilisées par une méthode reposant sur une dénaturation par un agent chaotrope (Urée) suivie d'une renaturation par dilution rapide de l'urée par dialyse (Burgess, 2009), avant purification par chromatographie d'affinité. Les profils de purification des trois protéines fusions contenant Bla sont présentés en Figure 37. La protéine d'intérêt est identifiée par un immunomarquage réalisé à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'étiquette poly-histidines (non montré).

Grâce à ce protocole, nous sommes parvenus à solubiliser les différentes protéines et à les purifier de manière très satisfaisante. Nous pouvons voir que les profils obtenus pour les différentes protéines sont similaires avec une bonne élimination des contaminations lors des lavages et des éluions efficaces avec relativement peu de contaminants par rapport à la quantité de protéine d'intérêt. Comme pour la purification des facteurs de transcription, nous observons que l'ajout de MD11 conduit à une perte importante de la protéine, qui ne s'accroche que partiellement à la résine. Cette perte est probablement liée aux propriétés physicochimiques du peptide de transduction. Nous observons au final des rendements de purification beaucoup plus faibles pour MD11-Bla que pour WW3-Bla mais surtout que Bla. Les fractions d'intérêt sont dialysées contre du DPBS pour réaliser les étapes suivantes.

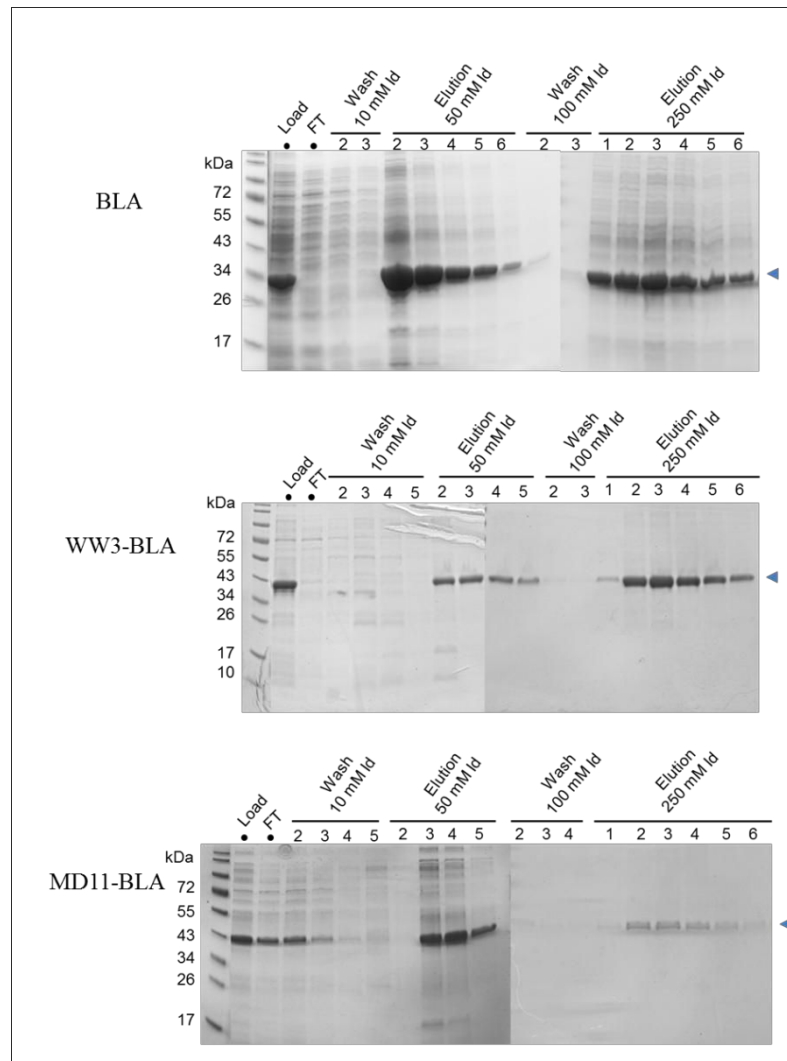


Figure 37. Purification par chromatographie d'affinité des différentes protéines fusion contenant Bla. Après production en système *E. coli* sous forme de corps d'inclusion (200 ml pour Bla, 100 ml pour WW3-Bla et MD11-Bla), les protéines sont dénaturées dans un tampon contenant 8M d'urée. Après une renaturation par dialyse, les protéines solubles (Load) sont chargées sur une résine de Nickel. Les protéines sont lavées et éluées par des concentrations croissantes d'Imidazole (Id). Les échantillons sont analysés par migration sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices, suivie d'une coloration au bleu de Coomassie.

ii. Analyse de l'activité Bla des différentes constructions

Afin de pouvoir utiliser ces différentes constructions pour la comparaison de l'efficacité des différents vecteurs, il nous faut en premier lieu vérifier que l'enzyme Bla, couplée aux différents domaines, conserve bien une activité d'hydrolyse des beta-lactames.

Pour cela nous avons mis au point un test enzymatique basé sur l'utilisation d'un substrat artificiel chromogène de l'enzyme, dont l'hydrolyse génère un produit absorbant fortement

à 490 nm. Nous avons ainsi mesuré les vitesses d'hydrolyse de ce substrat par MD11-Bla et WW3-Bla en comparaison de Bla, les trois protéines produites et purifiées selon le même protocole (Figure 38).

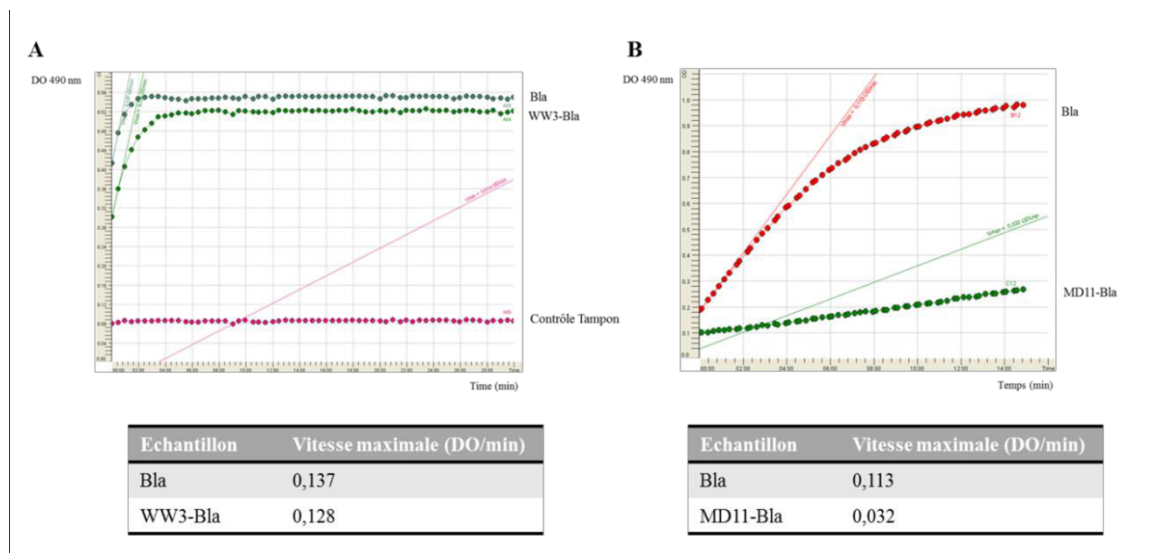


Figure 38. Analyse de l'influence des domaines WW3 (A) et MD11 (B) sur l'activité de Bla. Le test est réalisé à température ambiante avec 600 ng (A) et 800 (ng) de protéines purifiées et dialysées en DPBS. La vitesse d'hydrolyse de la nitrocéfine (en OD/min) est suivie pendant 30 min à 490 nm. Un contrôle négatif (tampon réactionnel sans enzyme) est réalisé pour le test avec WW3.

Au regard de ces résultats, nous pouvons ainsi considérer que l'activité de de MD11-Bla est quasiment nulle, dans ces conditions.

En conclusion, Bla semble donc un système rapporteur tout à fait adapté pour évaluer l'efficacité de vectorisation par le Dd. Il ne peut être utilisé pour MD11, étant donné que la protéine MD11-Bla ne présente pas d'activité significative. L'utilisation de la protéine rapportrice fluorescente verte GFP sera alors à privilégier pour les essais avec ce vecteur, d'autant plus que cette construction a déjà été utilisée par l'équipe de Jean-Luc Lenormand au sein du laboratoire, notamment pour la détermination de cette séquence minimale MD11 (Rothe *et al.*, 2010).

iii. Efficacité de vectorisation du dodécaèdre de l'adénovirus de type 3

Après avoir vérifié l'activité de la construction WW3-Bla, nous avons cherché à déterminer si le Dd était capable de transporter efficacement des protéines dans nos cellules cibles.

Un unique Dd est capable d'interagir avec 60 domaines WW via ses 60 bases du penton. Nous avons donc réalisé une première expérience au cours de laquelle le Dodécaèdre Fibre (DF) a été associé à différentes quantités de WW3-Bla, avant que le mélange ne soit mis en contact avec des CSH CD34⁺ de sang de cordon. Le DF purifié nous a été fourni par le Docteur Pascal Fender (EMBL, Grenoble).

Comme le montre la Figure 39A, nous n'observons aucune activité Bla au sein des CSH, et ce quelle que soit la quantité de DF de même que le ratio DF : WW3-Bla utilisé. Etant donné que l'enzyme couplée s'est avérée active lors des tests *in vitro* réalisés avec le substrat chromogène, cette absence d'activité Bla au sein des cellules semble due à un problème d'interaction entre le DF et le domaine WW3 associé à Bla. En effet, un immunomarquage dirigé à la fois contre le DF et Bla a permis de mettre en évidence la présence du DF au sein des cellules, mais pas de WW3-Bla (Figure 39B). Cette dernière information souligne néanmoins la capacité du Dd à pénétrer au sein des cellules CD34⁺, de manière dose-dépendante. L'hypothèse de non-association entre DF et WW3 a également été confirmée par la réalisation d'un test ELISA (données non montrées).

Nous avons alors émis l'hypothèse que notre domaine WW3-Bla ne possédait pas une conformation optimale pour l'interaction avec le Dd. Ceci est peut être lié à notre méthode de purification. La protéine WW3-GFP a finalement été utilisée afin d'analyser la capacité du Dd à transporter des protéines au sein des CSH, bien que nous ayons déjà mis en évidence, par immunomarquage, la capacité du vecteur à pénétrer au sein de ces cellules. Cette protéine nous a également été fournie par le Docteur Pascal Fender. Les résultats obtenus avec WW3-GFP combinée au DF à un ratio DF : WW3-GFP 1 : 60 sont présentés en Figure 39C.

Nous observons un signal fluorescent de plus en plus intense de même qu'une augmentation de la quantité de CSH injectées en fonction de l'augmentation de la concentration en dodécaèdre. A une concentration de 30 µg/ml de DF, environ 60 % des cellules présentent un signal GFP positif alors que c'est presque la totalité des cellules qui sont positives à une concentration de 300 µg/ml. La réalisation d'un contrôle sans dodécaèdre nous indique que la majorité du signal obtenu est lié à l'entrée de WW3-GFP grâce au dodécaèdre, bien que WW3-GFP semble aussi pouvoir rentrer seule à l'intérieur des cellules, en particulier à des concentrations élevées.

Enfin, nous avons voulu vérifier si le signal obtenu était bien lié aux protéines internalisées dans les cellules, et non pas simplement adhérentes à la membrane plasmique, à l'extérieur des cellules. Pour cela, nous avons réalisé, après l'étape de co-incubation cellules/DF, un traitement à la trypsine afin de dégrader les protéines présentes dans le milieu extracellulaire (Figure 39D). Nous n'observons aucune différence significative, à la fois en terme d'intensité de fluorescence par cellule mais aussi du nombre total de cellules injectées, avec ou sans traitement protéolytique à la trypsine. Le signal fluorescent émis par la GFP a donc une origine intracellulaire, confirmant ainsi que le Dd est capable de pénétrer efficacement au sein des CSH de sang de cordon, tout en transportant des protéines d'intérêt via l'interaction avec le domaine WW3.

A l'issue de ces expériences, le Dd peut être considéré comme un vecteur tout à fait adapté pour le transfert intracellulaire de protéines au sein de nos cellules d'intérêt. Bien que nous n'ayons pas réussi à réaliser la vectorisation de WW3-Bla, l'utilisation de la protéine fusion WW3-GFP nous a permis de mettre en évidence le transport efficace de protéines via cette particule pseudo-virale. Une explication possible de l'absence d'interaction entre WW3-Bla et le Dd est le mode de purification, basé sur une étape de dénaturation/renaturation pouvant générer au final une protéine mal repliée, contrairement à la purification de WW3-GFP, réalisée en conditions non dénaturantes (Villegas-Mendez *et al.*, 2010). Etant donné que la purification des facteurs de transcription Oct4 et Sox2 couplés à WW3 ont été réalisées par affinité en conditions natives, nous pouvons espérer que leur interaction avec le Dd sera efficace.

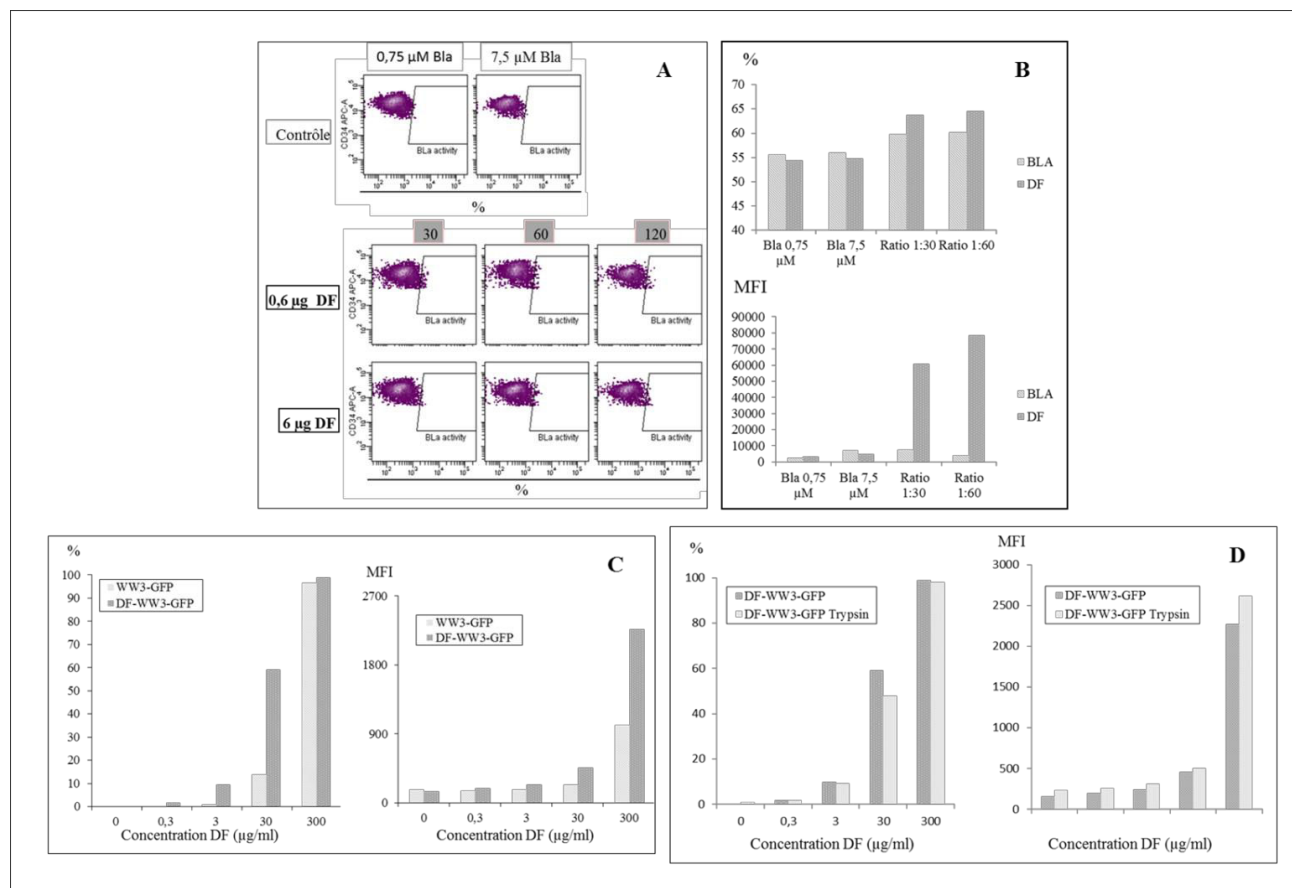


Figure 39. Evaluation de l'efficacité du transport intracellulaire de protéines recombinantes par le DF au sein de CSH. Les cellules sont distribuées en tubes à cytométrie à 100 000 cellules par tube environ 3h avant le traitement. Les CSH sont ensuite incubées pendant 2h à 37°C avec différentes quantités de DF préalablement mis en contact avec WW3-Bla à différents ratios (1 : 30, 1 : 60, 1 : 120) (A, B) ou WW3-GFP à un ratio 1 : 60 (C, D). Les analyses sont réalisées en cytométrie en flux, par mesure de l'activité Bla grâce CCF2 (A), immunomarquage dirigé contre le DF et Bla (B) ou analyse du signal GFP (C,D). Les cellules CD34⁺ sont identifiées par un marquage à l'aide d'une IgG2a couplée APC. Des contrôles sont réalisés avec WW3-Bla seule (A, B), WW3-GFP seule (C) ou par traitement des cellules à la trypsine après l'étape d'incubation (D).

iv. Efficacité de vectorisation du domaine minimal MD11 de la protéine Zebra

Le dernier vecteur que nous avons évalué en termes d'efficacité de vectorisation intracellulaire de protéines est le domaine minimal MD11 du peptide Zebra.

Etant donné que MD11-Bla n'est pas active dans nos conditions, nous avons décidé d'utiliser la protéine fusion MD11-GFP, produite par le groupe du Professeur Jean-Luc Lenormand (Equipe TheREx). Des concentrations croissantes de la protéine ont été utilisées. Les résultats obtenus sur les CSH sont présentés en Figure 40.

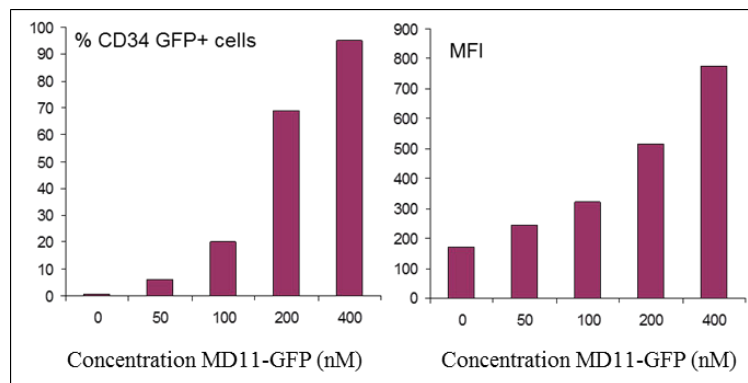


Figure 40. Evaluation de l'efficacité du transport intracellulaire de protéines recombinantes par MD11 au sein de CSH. Les cellules sont distribuées en tubes de cytométrie à 100 000 cellules par tube 3h avant le traitement. La protéine MD11-GFP purifiée est incubée avec les cellules en DPBS pendant 1h à 37°C. L'analyse du signal GFP est réalisée en cytométrie en flux, après réalisation d'un "gating" sur la population de cellules CD34+ par un marquage à l'aide d'une IgG2a couplée APC.

Le signal GFP intracellulaire augmente considérablement en fonction de la concentration de MD11-GFP, avec plus de 90% de cellules émettant un signal positif pour une concentration de 400 nM. Bien qu'aucun contrôle permettant de s'assurer de l'origine intracellulaire du signal n'ait été réalisé durant cette expérience, les travaux de thèse de Roberta Marchione au sein de l'équipe TheREx, ont permis de mettre en évidence, notamment par microscopie confocale, que le peptide MD11 couplé à différentes protéines, utilisé selon un protocole d'internalisation similaire, permettait une pénétration rapide des protéines fusion à l'intérieur de nombreuses lignées cellulaires (Marchione *et al.*, 2015).

En résumé, le peptide de transduction MD11 représente un troisième vecteur capable de transporter des protéines d'intérêt au sein des CSH. Etant donné que MD11 et le Dd ont été testés lors de deux expériences différentes, il nous est impossible de comparer les efficacités relatives des deux vecteurs. Néanmoins, tout comme le Dd, MD11 présente un potentiel de pénétration cellulaire intéressant au sein des CSH, avec un pic d'efficacité, en termes de quantités de cellules transduites, à une concentration relativement faible, aux alentours de 400 nM.

IV. Sélection du vecteur à développer pour la reprogrammation cellulaire

La première partie de ce projet était destinée à sélectionner, parmi les vecteurs de protéines développés par l'équipe TheREx du laboratoire TIMC-IMAG, le vecteur le plus adapté à une utilisation pour la reprogrammation de cellules somatiques.

Au cours de cette première partie, nous avons réalisé les constructions moléculaires et généré les différentes souches produisant les deux facteurs de reprogrammation centraux, Oct4 et Sox2, mais aussi la protéine rapportrice Bla, couplée aux différentes séquences de vectorisation, à savoir ExoS54 pour le SST3 de *P. aeruginosa*, le domaine minimal MD11 du peptide Zebra, ainsi que le domaine WW3 interagissant avec le Dd de l'Ad3.

Il a ensuite été nécessaire de mettre au point les méthodes de purification de ces vecteurs, puis d'évaluer leur influence sur l'interaction des facteurs de transcription avec leur séquence cible ainsi que leur efficacité à transporter des protéines au sein des cellules sélectionnées pour réaliser la reprogrammation, à savoir les CSH de sang de cordon et les fibroblastes dermiques néonataux. Toutes ces étapes ont nécessité de nombreuses mises au point et optimisation et ont ainsi occupé une partie considérable du temps de thèse.

En effet, la sélection du vecteur optimal est une étape clé, dont va dépendre la suite du projet. Il est donc essentiel de prendre en compte tous les éléments de réflexion à notre disposition avant de faire un choix, le plus objectif possible.

Le vecteur optimal doit être facile à produire et à utiliser, présenter une bonne efficacité de transfert de protéines cargo au sein des cellules d'intérêts, mais aussi ne pas altérer la

fonction de la protéine transportée. Un comparatif des différents vecteurs est présenté dans le Tableau 20.

Tableau 20. Avantages et inconvénients des différents vecteurs évalués comme outils de reprogrammation cellulaire.

Critères d'évaluation	VECTEURS		
	DODECAEDRE	MD11	SST3
Facilité et efficacité de production et de purification des protéines couplées	- Niveau d'expression élevé - Bons rendements de production (après optimisation)	- Niveau d'expression modéré - Rendements de production relativement faibles (après optimisation) - Nouvelles optimisations à prévoir	- Aucune optimisation nécessaire - Aucune étape de purification nécessaire
Charge de travail (de la production à la vectorisation)	~72h - Production et purification des protéines couplées (et du Dd) - Dialyse - Association Dd/WW3 - Co-incubation	~48h - Production et purification des protéines couplées - Dialyse - Co-incubation	~24h - Production des protéines - Injection intracellulaire directe
Efficacité de vectorisation	+ CSH, non évalué sur fibroblastes BJ	+ CSH, non évalué sur fibroblastes BJ	+ CSH et Fibroblastes BJ, après optimisation
Influence de la séquence de vectorisation	Aucune (Interaction WW3-Oct4 à séquence cible comparable à celle d'Oct4)	Aucune / Altération (Interaction MD11-Oct4 sur sa séquence cible comparable à celle d'Oct4 ; mais MD11-Bla inactive)	Amélioration (Affinité ExoS54-Oct4 semble supérieure à celle d'Oct4 pour sa séquence cible)

Nous avons constaté que les trois vecteurs étaient tous capables de transporter des protéines efficacement au sein des CSH, le choix du vecteur optimal a donc été guidé par d'autres paramètres. Par manque de temps, l'efficacité de vectorisation de MD11 et du Dd n'a pas pu être évaluée sur la lignée de fibroblastes BJ ; le SST3 est également efficace sur cette lignée.

1. Production et purification

Alors que les protéines associées au domaine WW3 sont produites à un niveau assez élevé en système *E. coli*, et que les rendements de purifications sont relativement bons, les niveaux de production et rendement de purification associés à MD11 sont beaucoup plus

faibles. Les protéines transportées par le SST3, ne nécessitent quant à elles aucune étape de purification. Nous avons ainsi décidé d'éliminer le peptide MD11 sur ce premier critère.

2. Protocole de production et influence sur les facteurs de transcription

Afin de choisir entre le Dd et le SST3, nous avons analysé la difficulté de mise en œuvre du protocole de production ainsi que l'influence de ces séquences sur les facteurs de transcription. Alors que plusieurs jours et de nombreuses étapes sont nécessaires pour réaliser la production et la purification d'une protéine couplée à WW3, mais aussi du Dd, il devient possible, avec le SST3 de coupler production et injection des facteurs dans une même journée, avec un nombre d'étapes limité. De plus, pour nos essais, nous n'avons pas eu à produire et purifier le Dd, mais ce dernier demande de mettre en place un protocole de production en cellules d'insectes ainsi qu'une nouvelle méthode de purification par échange d'ions (Fender *et al.*, 1997). En ce qui concerne l'influence de la séquence de vectorisation sur l'affinité des facteurs de transcription pour leur séquence nucléotidique consensus, bien que WW3 ne modifie pas l'affinité d'Oct4 pour sa cible, ExoS54 semble améliorer cette interaction.

3. Choix et Perspectives

Nous avons donc décidé de conserver le vecteur SST3 de *P.aeruginosa*, qui, par sa facilité d'utilisation, son efficacité de vectorisation au sein de nos deux types cellulaires d'intérêt, son influence bénéfique sur l'interaction entre les facteurs de transcription et leur séquence nucléotidique cible, semble le plus adapté dans l'optique d'une utilisation comme outils de reprogrammation cellulaire.

Alors que les protéines sont déjà utilisées pour générer des iPS à partir de cellules humaines, la génération d'iPS humaines à l'aide de cette micro-seringue naturelle serait très originale. Nous allons maintenant chercher à démontrer que le SST3 est capable d'injecter différents facteurs de transcription embryonnaires dans nos types cellulaires d'intérêt et que ces facteurs couplés à ExoS54 sont capables d'activer la transcription des gènes impliqués

dans la pluripotence. La toxicité du vecteur, non étudiée dans la première partie consacrée à la comparaison, sera également analysée.

Les autres vecteurs n'ont pas pour autant été abandonnés au laboratoire. Le vecteur MD11 est notamment en cours de développement et d'optimisation pour la reprogrammation cellulaire. Ces travaux sont réalisés par Benjamin Caulier, doctorant au sein de l'équipe TheREx.

CHAPITRE 2

Vectorisation de facteurs de transcription embryonnaires par le SST3 de *P.* *aeruginosa*

Dans cette partie, nous avons cherché à démontrer que le SST3 de *P. aeruginosa* était capable d'injecter des facteurs de transcription actifs aux seins des cellules cibles, permettant d'induire la transcription des gènes de pluripotence. Nous avons également cherché à optimiser les conditions d'utilisation du SST3 comme outils de reprogrammation cellulaire. Dans l'optique d'obtenir des résultats les plus reproductibles possibles, nous avons réalisé la plupart des expériences sur les fibroblastes BJ. En effet, contrairement à une lignée de cellules en culture, les CSH isolées à partir de sang de cordon ombilical, présentent une variabilité inter-individus non négligeable pouvant rendre difficile l'interprétation de certains résultats dans la phase de mise au point.

I. Translocation des différents facteurs de transcription via le SST3

La reprogrammation de cellules somatiques en iPS est induite grâce à l'apport d'une combinaison de facteurs de transcription exogènes, permettant la mise en place du réseau de régulation de la pluripotence.

Le nombre de facteurs de transcription nécessaires est lié à la maturité de la cellule à reprogrammer mais aussi à la concentration intracellulaire en facteurs exogènes qui peut être atteinte. Les deux combinaisons les plus répandues sont les cocktails des équipes de Yamanaka (Takahashi *et al.*, 2007) et de Thomson (Yu *et al.*, 2007b), à savoir Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc (OSKM) et Oct4, Sox2, Nanog, Lin28a (OSNL), respectivement. Il a également été montré que l'utilisation de six facteurs simultanément permettait la reprogrammation de cellules très réfractaires, telles que des cellules prélevées chez des individus centenaires ou bien des cellules sénescents (Lapasset *et al.*, 2011).

Avant de choisir la combinaison, nous avons vérifié, dans un premier temps, que chacun des facteurs était capable d'être acheminé par le SST3. Nous avons dans un premier temps réalisé l'insertion des différentes séquences nucléotidiques codant les quatre autres facteurs de transcription au sein du plasmide pEAI, permettant l'expression des protéines portant l'étiquette ExoS54. Pour cela les séquences ont été synthétisées par la société Genecust puis introduites dans le pEAI à la place d'Oct4. Un nouveau test de sécrétion a été réalisé avec les souches OST et OST- Δ uvrAB pour vérifier la translocation de ces différents facteurs (Figure 41).

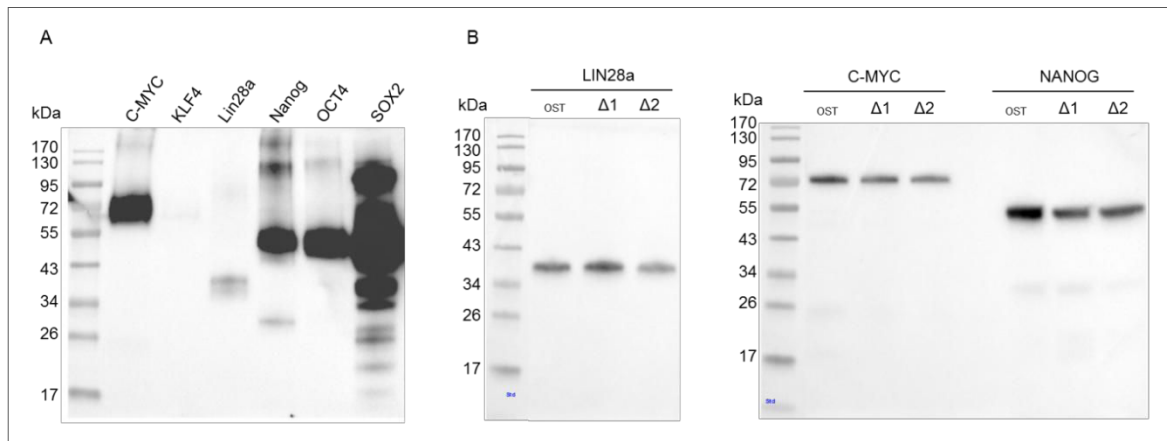


Figure 41. Sécrétion des six facteurs de reprogrammation par le SST3 de *P. aeruginosa*. (A) Sécrétion des six facteurs de transcription réalisée par la souche OST. La même quantité de protéines totales précipitées à partir des surnageants de culture a été déposée dans chaque puits (15 µg). La révélation par chimiluminescence est réalisée grâce à un anticorps dirigé contre le tag poly-histidines, couplé à la HRP. (B) Sécrétion de Lin28a, c-Myc et Nanog par la souche OST-ΔuvrAB. Deux clones, Δ1 et Δ2, sont testés pour chaque construction. La souche OST est utilisée comme contrôle. La révélation est réalisée de la même manière. Poids moléculaires théoriques : ExoS54-cMYC : 55,6 kDa ; ExoS54-KLF4 : 58,3 kDa ; ExoS54-Lin28a : 29,6 kDa ; ExoS54-Nanog : 41,7 kDa.

Les résultats indiquent que pour la souche OST, en plus d'Oct4 et Sox2, les facteurs c-Myc, Nanog et Lin28a sont bien vectorisés via le SST3 puisque l'on retrouve ces facteurs de transcription dans les surnageants de sécrétion. Il est important de noter que les facteurs sont sécrétés à des niveaux assez variables, en particulier Sox2 qui est extrêmement bien sécrété et Lin28a pour lequel le niveau de sécrétion est relativement faible. En revanche, Klf4, ne semble pas être sécrété via le SST3, puisque sa présence dans le surnageant de sécrétion n'a jamais pu être mise en évidence, en dépit d'expériences répétées. Une analyse des culots bactériens a montré que Klf4 était produit, mais à un niveau très faible (données non montrées). Pour essayer de répondre à ce problème de production, nous avons dessiné une séquence nucléotidique optimisée codant Klf4, avec les codons les plus fréquents chez *P. aeruginosa*. Cependant, les niveaux de production obtenus n'étaient pas significativement différents avec ou sans optimisation des codons.

Il est intéressant de noter que les facteurs de transcription migrent pour la plupart à des poids moléculaires supérieurs à ceux attendus. Une des explications rationnelles peut être la présence d'ADN bactérien sur lesquels les facteurs de transcription se sont fixés, ralentissant ainsi la migration électrophorétique.

Nous remarquons que les trois autres facteurs Lin28a, c-Myc et Nanog sont également sécrétés par la souche OST-ΔuvrAB. Par contre la sécrétion d'ExoS54-Klf4 n'a pas été testée avec cette souche, étant donné que les niveaux de sécrétion sont généralement inférieurs à ceux de la souche OST, pour une même protéine.

Ces résultats indiquent qu'au moins cinq des facteurs de transcription les plus utilisés dans la bibliographie peuvent être transportés par le SST3 de *P. aeruginosa*. De plus, nous avons démontré précédemment que la séquence ExoS54 ne perturbait pas la fixation d'Oct4 sur sa séquence d'ADN cible. La prochaine étape sera de vérifier si les facteurs sont bien injectés au sein des cellules à reprogrammer, jusqu'au noyau, où ils seront capables d'induire la transcription de leurs gènes cibles. Différentes combinaisons pourront être réalisées, en particulier, le cocktail de Thomson OSLN, pourra être employé.

II. Preuve de concept de l'injection des FT dans les cellules cibles

1. Les facteurs injectés sont adressés au noyau

Nous avons démontré lors des étapes précédentes que le SST3 de *P. aeruginosa* était capable d'injecter efficacement des facteurs de transcription au sein des cellules d'intérêt à reprogrammer, et que cinq des six facteurs de reprogrammation principaux (Oct4, Sox2, Nanog, Lin28a et c-Myc) étaient transportés efficacement via le SST3, lors de tests de sécrétion *in vitro*.

Les facteurs de transcription peuvent exercer leur fonction uniquement s'ils sont acheminés jusqu'au noyau. C'est pourquoi nous avons voulu vérifier si les facteurs de transcription étaient bien injectés dans les cellules à reprogrammer et s'ils étaient acheminés jusqu'au noyau des cellules. Pour cela, les trois facteurs constituant le noyau central (Oct4, Nanog, Sox2) ont été injectés individuellement à une MOI de 50 via le SST3 au sein de fibroblastes BJ, pendant 1h, suivant le schéma d'injection classique. Afin de vérifier à la fois la localisation mais aussi la persistance des facteurs injectés, la détection des facteurs a été réalisée par immunofluorescence en microscopie confocale, à 1h, 3h et 15h après injection. Les résultats sont présentés en Figure 42.

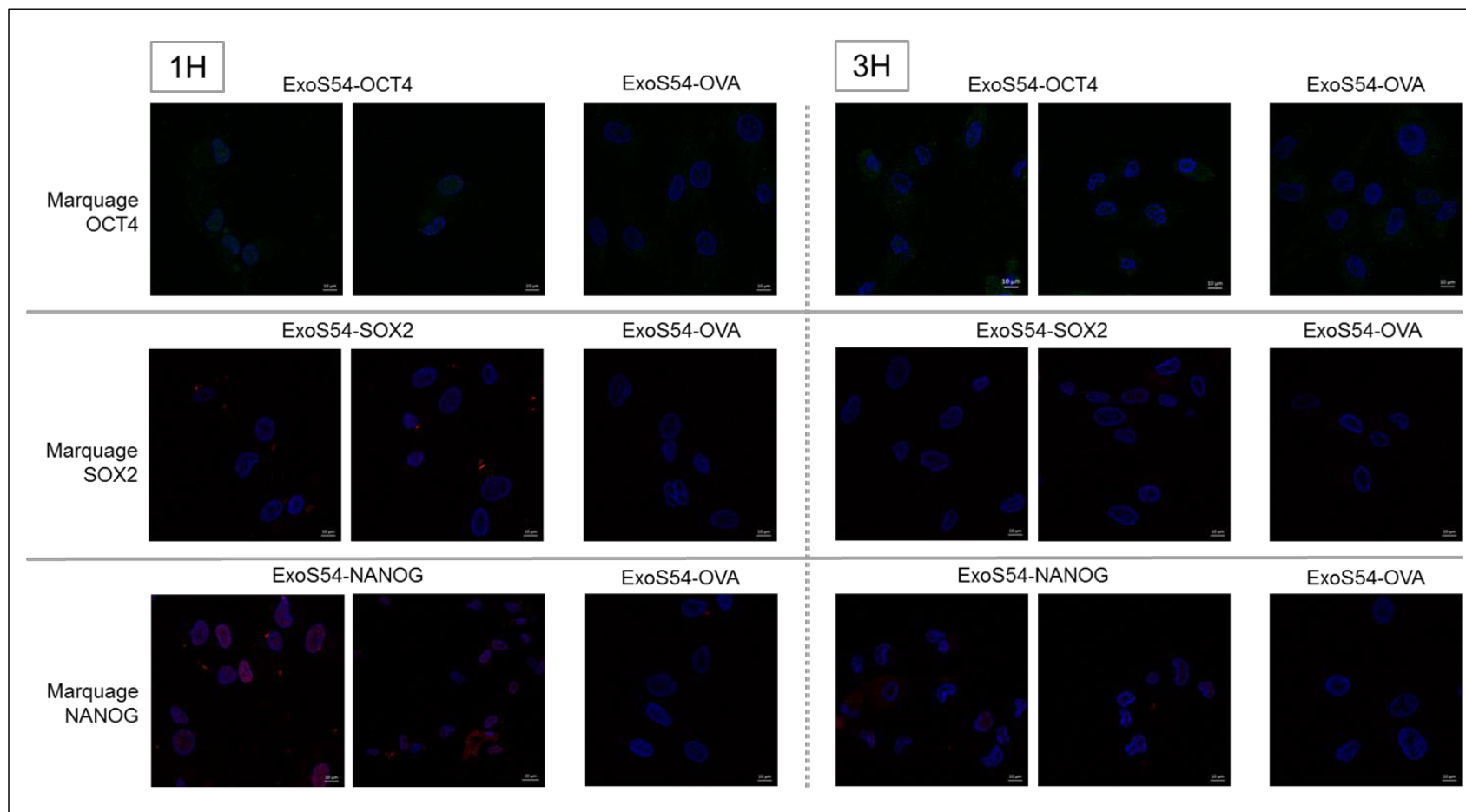


Figure 42. Analyse par microscopie confocale de la localisation des facteurs de transcription injectés via le SST3 de *Pseudomonas aeruginosa* au sein de fibroblastes BJ. Les cellules ont étéensemencées 24h avant l'injection à 40 000 cellules par puits en Lab-Tek 8 chambres en borosilicate de type I. Les facteurs Oct4, Sox2 et Nanog et la protéine contrôle Ova sont injectés individuellement pendant 1h à 37°C grâce à l'utilisation de la souche OST à MOI 50. Les cellules sont fixées à 1h, 3h et 15h après injection et la détection des facteurs de transcription réalisée après perméabilisation grâce à l'utilisation d'anticorps primaires couplés à des fluorochromes : IgG1 souris anti-Oct4 couplée Alexa Fluor 488, IgG1 souris anti-Sox2 couplée Alexa Fluor 647 et IgG1 souris anti-Nanog couplée Alexa Fluor 647. Le marquage du noyau est réalisé au DAPI.

Nous observons pour les trois facteurs de transcription couplés à ExoS54 une localisation nucléaire dès 1h après la fin de l'injection, ce qui montre le caractère rapide de l'adressage nucléaire. Nanog semble le facteur présent en plus grande quantité, devant Oct4 puis Sox2. Cette dernière observation est à nuancer avec le fait que des fluorochromes différents sont utilisés selon la cible. A 3h les facteurs de transcription sont toujours présents au niveau du noyau des fibroblastes, en quantité plus faible qu'à 1h mais dans des proportions comparables. A 15h, en revanche, aucun signal significatif ne peut être mis en évidence par cette technique. Il est important de noter que nous observons un signal diffus au niveau du cytoplasme avec le marquage anti-Oct4, aussi bien présent lors de l'injection d'ExoS54-Oct4 qu'avec le contrôle ExoS54-Ova. L'observation de cellules non traitées a permis de corrélérer ce signal à une autofluorescence importante des cellules à cette longueur d'onde (525 nm) (données non montrées). De la même manière, nous observons avec les anticorps dirigés contre Sox2 et Nanog quelques points où le marquage est très intense, dans des zones extranucléaires. L'analyse en lumière transmise nous a permis de mettre en évidence la présence de débris cellulaires dans ces zones, responsables d'un marquage non spécifique (données non montrées).

Ainsi, nous n'observons aucun signal significatif émis à partir du cytoplasme, et ce aux différents temps après translocation, ce qui démontre l'efficacité et la rapidité de l'adressage des facteurs via leur séquence de localisation nucléaire.

Pour résumer, ces données mettent en évidence une accumulation rapide des facteurs au niveau nucléaire, ce qui constitue l'un des atouts majeurs de notre vecteur. Toutefois, la dégradation des protéines injectées semble relativement rapide puisque le marquage spécifique est déjà plus faible à 3h et indétectable à 15h. Les données de la littérature indiquent que la reprogrammation de cellules en iPS par transfert de protéines nécessite de traiter les cellules régulièrement, voir de manière journalière, avec les facteurs de transcription, principalement à cause de ce phénomène de "turnover" rapide des protéines (Li *et al.*, 2014).

Il reste désormais à vérifier que les facteurs injectés sont capables d'activer efficacement la transcription des gènes de pluripotence et à évaluer la persistance de cet effet, avant d'établir un protocole de reprogrammation en déterminant notamment la fréquence d'injection, dans la perspective de générer des iPS.

2. Les facteurs injectés sont actifs

Nous avons démontré dans la première partie que la séquence ExoS54 ne perturbait en rien la fixation d'Oct4 à sa séquence d'ADN cible, grâce à la réalisation d'un test *in vitro*. De plus, nous avons également montré, par microscopie confocale, que les facteurs de transcription injectés étaient acheminés jusqu'au noyau en moins de 2h. Cependant, ces résultats n'assurent en rien la capacité des facteurs couplés à ExoS54 et injectés via le SST3, à induire la transcription de leur gène cible.

Nous avons alors réalisé des expériences dans lesquelles le niveau de ces transcrits au sein des fibroblastes BJ est mesuré par PCR quantitative en temps réel (qPCR), après une ou trois injections via le SST3 à MOI 100 (Figure 43). Les cibles sélectionnées sont *nanog*, *pou5f1* (*oct4*), et *sox2*, car nous avons vu précédemment qu'ils constituent le noyau central du réseau de pluripotence et qu'il existe des boucles de régulation positives directes entre eux. La méthode de quantification choisie repose sur la mesure de l'incorporation de SYBR Green au cours de l'amplification de l'ADNc, préalablement obtenu par reverse-transcription des ARNm en utilisant une amorce complémentaire des queues poly(A).

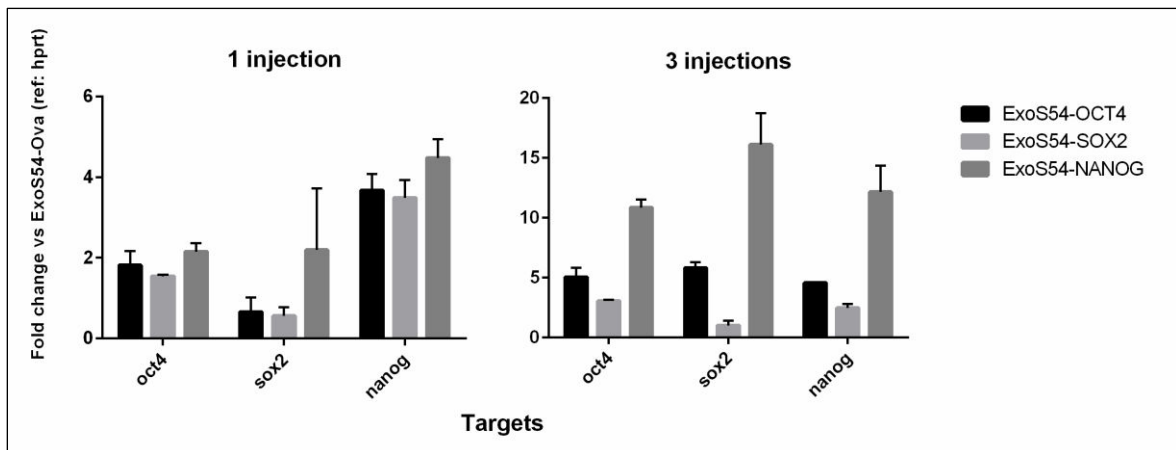


Figure 43. Variations de l'expression de gènes de pluripotence après injections des facteurs de transcription via le SST3 au sein de fibroblastes BJ. Les cellules sontensemencées à 125 000 cellules par puits en plaque 24 puits la veille de l'injection en milieu avec de l'acide valproïque (VPA) à 125 μ M pendant 24h. Les facteurs de transcription Oct4, Sox2 et Nanog ou le contrôle Ova sont injectés individuellement au sein de fibroblastes BJ. Trois injections à MOI 100 sont réalisées à 24h d'intervalle. Les cellules sont lysées et les ARN purifiés après 1 et 3 injections. Les gènes cibles *oct4*, *sox2* et *nanog* sont utilisés comme cibles en qPCR, avec *hprt* comme gène de référence. Les mesures ont été effectuées en duplicat pour les gènes cibles.

Les résultats indiquent une activation importante de la transcription dès 24h après la première injection, en particulier avec ExoS54-Oct4 et ExoS54-Nanog, pour lesquels le niveau de transcription des différents gènes cibles est augmenté d'environ deux et quatre fois, respectivement. Les résultats sont plus nuancés avec ExoS54-Sox2, pour lequel il ne semble pas y avoir d'activité transcriptionnelle significative au niveau des promoteurs d'*oct4* et *sox2*. Après trois injections, les résultats sont encore plus marqués avec des expressions augmentées d'un facteur oscillant entre 10 et 15 selon la cible pour ExoS54-Nanog et environ 5 pour ExoS54-Oct4. Les résultats obtenus avec ExoS54-Sox2 sont plus faibles, comme après une seule injection, mais l'augmentation de la transcription est plus prononcée, avec un facteur 3 pour *oct4* et environ 2,5 pour *nanog*.

Ces résultats ont été obtenus en présence d'acide valproïque. Cet inhibiteur des HDAC est connu pour favoriser le processus de reprogrammation en facilitant l'accès des facteurs embryonnaires au niveau de leurs promoteurs cibles. Toutes ces mesures ont été réalisées avec l'utilisation d'un contrôle très pertinent, à savoir l'injection d'une protéine en théorie neutre (Ova), permettant ainsi de ne pas confondre l'effet du facteur de transcription avec l'effet de la translocation en elle-même et du contact entre bactéries et cellules, à l'origine de signaux cellulaires potentiellement forts pouvant modifier le transcriptome cellulaire.

Il est à noter que ces données d'activité transcriptionnelle sont en accord avec la quantité relative de chaque facteur adressée au noyau, déterminée par microscopie confocale (Nanog > Oct4 > Sox2), ce qui laisse penser que les différences d'activité observées entre les facteurs sont aussi liées à des différences de concentration au niveau nucléaire. Pour ce qui est de Sox2, ce facteur joue un rôle de co-activateur transcriptionnel d'Oct4 au niveau de nombreux promoteurs pour lesquels il a été montré que son activité n'était pas essentielle à l'activation de la transcription. Il n'est donc pas étonnant d'obtenir une réponse plus modérée avec ce facteur.

Une des forces de notre vecteur bactérien est qu'il est capable de générer une réponse relativement forte dès 24h après injection d'Oct4 ou Nanog, avec des niveaux comparables à ce qui est observé avec des vecteurs rétroviraux et bien plus forts qu'avec les facteurs couplés au domaine poly-arginines R₁₁. En effet, Lee et ses collaborateurs ont montré qu'aucune variation de la transcription de *nanog* n'était induite par les facteurs Oct4 et Sox2 couplés à un domaine poly-arginines R11 à 24h après transduction, contre une

augmentation d'un facteur 5 avec un vecteur rétroviral (Lee *et al.*, 2012), soit une valeur comparable à ce que nous obtenons. Ainsi, ces données mettent en avant la capacité du SST3 de *P. aeruginosa* à injecter des facteurs de transcription au sein de fibroblastes BJ. Ces facteurs sont ensuite acheminés jusqu'au noyau où ils sont capables d'induire la transcription au niveau de leurs gènes cibles, et ce dès 24h après la translocation.

Enfin, nous avons réalisé les mêmes tests d'activation transcriptionnelle avec ExoS54-Oct4 et ExoS54-Sox2 sur les CSH de sang de cordon afin de vérifier si le SST3 est également un vecteur efficace pour la reprogrammation de ce type cellulaire (Figure 44). Pour l'ensemble des cibles, excepté *sox2*, nous observons une activation transcriptionnelle, par ExoS54-Oct4 ou ExoS54-Sox2, beaucoup plus faible au sein des CSH par rapport aux fibroblastes. Par exemple, l'activation de *Nanog* et *Oct4* par ExoS54-Oct4 est respectivement 10 et 8 fois plus importante au sein des fibroblastes. Ces résultats nous indiquent que le SST3 est moins efficace pour induire l'expression des gènes de pluripotence au sein des CSH isolées à partir de sang de cordon. Ces différences observées sont très certainement liées, du moins en grande partie, à la différence d'efficacité de translocation qui existe entre ces deux types cellulaires. La différence de type cellulaire est également très certainement à l'origine d'une partie de ces variations.

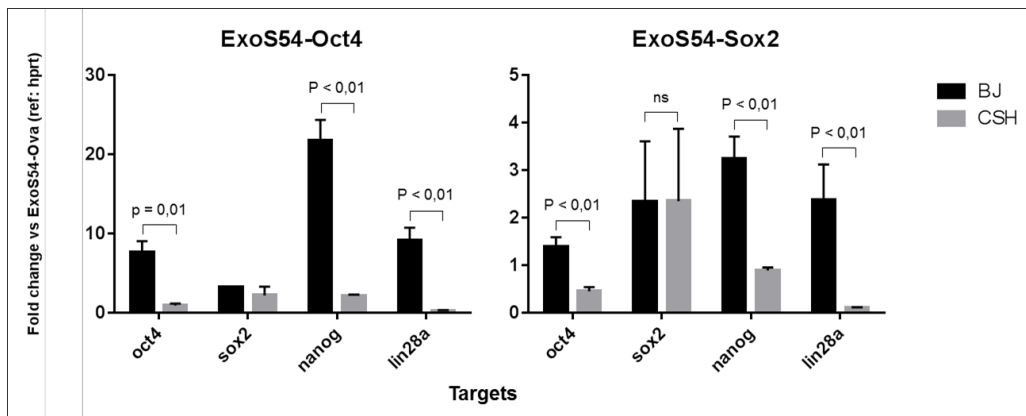


Figure 44. Différences d'induction de l'expression de gènes de pluripotence entre fibroblastes BJ et CSH de sang de cordon après injection des facteurs de transcription via le SST3. Les cellules sontensemencées 24h avant la première injection en plaques 24 puits et en présence de VPA à 125 μ M, à 130 000 cellules par puits pour les fibroblastes et 210 000 cellules par puits pour les CSH. Les facteurs de transcription Oct4, Sox2 ou le contrôle Ova sont injectés individuellement au sein de fibroblastes BJ. Trois injections à MOI 100 sont réalisées à 24h d'intervalle. Les cellules sont lysées et les ARN purifiés après 3 injections. Les gènes *oct4*, *sox2*, *nanog* et *lin28a* sont utilisés comme cibles en qPCR, avec *hprt* comme gène de référence. Les mesures ont été effectuées en triplicat. Les "p-values" ont été déterminées à l'aide d'un test t de Student.

CHAPITRE 3

Optimisation des conditions de vectorisation par le SST3

Nous avons démontré qu'il était possible, grâce au SST3 de *P. aeruginosa*, d'induire rapidement et efficacement l'activation de l'expression de gènes impliqués dans la mise en place et le maintien du réseau de pluripotence. Le SST3 allie la puissance transcriptionnelle d'un vecteur intégratif avec les propriétés d'un vecteur non intégratif, puisqu'aucun acide nucléique n'est vectorisé via le SST3. De plus, sa facilité d'utilisation ainsi que la rapidité du processus d'injection sont deux atouts supplémentaires et font de cet injectisome une véritable exception parmi les vecteurs de protéines.

Au cours de cette seconde partie du projet, nous avons cherché à identifier les paramètres limitants du vecteur et à les optimiser pour améliorer au maximum les conditions de translocation de facteurs de transcription embryonnaires au sein des cellules à reprogrammer. Nous avons dans un premier temps travaillé sur la réduction de la toxicité cellulaire ainsi que sur la sécurisation du vecteur via une comparaison entre le protocole classique réalisé avec la souche OST et le protocole d'atténuation KBMA utilisant la souche OST- Δ uvrAB. Les efficacités de vectorisation relatives ont été étudiées en parallèle, et prises en considération pour le choix de la souche. Nous avons également cherché à vérifier si nous parvenions à éliminer efficacement les bactéries des cultures de cellules eucaryotes. D'autre part, la combinaison optimale de facteurs de transcription a été mise au point. Enfin, nous avons démontré qu'il était possible de standardiser le protocole d'injection de facteurs de transcription grâce à la mise au point d'un protocole de congélation de bactéries prêtes à injecter.

I. Sécurisation du procédé : OST ou OST- Δ uvrAB ?

Nous avons montré que l'injection de facteurs de transcription embryonnaires au sein de CSH et de fibroblastes par la souche OST, via son SST3, induisait la transcription au niveau de gènes cibles clés impliqués dans le réseau de pluripotence.

Cependant, nous avons remarqué, que des injections à une MOI relativement élevée (50 et plus) des facteurs Oct4 et surtout Nanog, conduisaient à un changement de morphologie rapide des cellules et à une mort cellulaire considérable dans les 24h, sur les fibroblastes. Ceci nécessite d'évaluer la toxicité d'injections répétées avec de telles charges bactériennes. En effet, *P. aeruginosa* et son SST3 sont associés à une cytotoxicité relativement importante, en dehors de l'activité des exoenzymes normalement injectées par les souches sauvages. Cette toxicité peut être attribuée à plusieurs facteurs :

- l'activité intrinsèque des facteurs de transcription injectés. En effet, il a été montré que de nombreuses cibles de ces facteurs étaient impliquées dans l'apoptose. La reprogrammation avec la combinaison OSKM est d'ailleurs associée à une mortalité de l'ordre de 50% à 48h après le début de la reprogrammation (Soufi and Zaret, 2013).
- l'activité "pore-forming" du SST3, à l'origine d'une perméabilité cellulaire aux petites molécules et aux ions. Cette activité, associée à la formation d'un canal protéique par les protéines structurales PopB et PopD, est responsable d'une mort cellulaire par un mécanisme nommé oncosis, caractérisé par l'accumulation de bactéries sous forme d'essaim autour des cellules. (Dacheux *et al.*, 2001). D'autre part, la protéine PopB est également responsable d'une nécrose cellulaire (Galle *et al.*, 2012).
- les nombreux facteurs de virulence cellulaires et extracellulaires de la bactérie décrits précédemment.

Nous avons ainsi cherché à vérifier si la technologie KBMA était applicable à la reprogrammation cellulaire. La technologie KBMA, basée sur un traitement photochimique de la souche OST- Δ uvrAB, bloque la prolifération de la bactérie mais permet de conserver un SST3 et un métabolisme partiellement actifs. La limitation de la prolifération de la bactérie est potentiellement associée à une réduction de la toxicité liée à

une diminution de la quantité de chaque facteur de virulence en contact des cellules à reprogrammer.

Le protocole classique réalisé avec la souche OST a donc été comparé au protocole utilisant la souche OST- Δ uvrAB. Nous avons évalué l'apport de ce traitement photochimique atténuateur non seulement sur la toxicité, mais aussi sur les efficacités de vectorisation et d'activation transcriptionnelle liées en grande partie à l'activité de translocation du SST3.

Ce protocole est également très intéressant dans la perspective de proposer un procédé de production d'iPS utilisable en clinique, puisqu'il permet de supprimer le risque de dissémination de la bactérie.

1. Paramètre n°1 : Toxicité

i. Influence du traitement photochimique atténuateur KBMA sur la cytotoxicité induite par *P. aeruginosa*

Nous avons tout d'abord cherché à déterminer la MOI limite en terme de toxicité sur les fibroblastes BJ, avec les souches OST et OST- Δ uvrAB atténuée par traitement photochimique.

Pour réaliser cette comparaison, les deux facteurs couplés ExoS54-Oct4 et ExoS54-Nanog ont été injectées dans les cellules cibles par les deux souches à différentes MOI. Deux temps d'injections différents, 1h et 3h, ont été employés et les mesures ont été réalisées à 3h et 18h après injection, afin de vérifier la mort cellulaire précoce et tardive. La toxicité a été évaluée par mesure du marquage Annexin-V (apoptose) et de l'incorporation de 7-AAD (nécrose) ; les cellules Annexin-V⁻/7-AAD⁻ étant considérées comme vivantes (Figure 45).

Alors que la technologie KBMA n'est absolument pas toxique pour les cellules, quelle que soit la protéine injectée et le temps d'injection, la souche OST montre une certaine toxicité vis-à-vis de ces cellules. Avec ExoS54-Oct4 injectée pendant 3h, nous observons une toxicité significative à 18h post-injection, même à une MOI faible de 10, avec un peu moins de 83% de cellules vivantes contre plus de 94% pour les cellules non traitées et les cellules traitées avec le protocole KBMA. Il est d'ailleurs important de noter que pour une injection de 3h, la technologie KBMA est moins toxique à une MOI très élevée de 200 que

la souche OST à une MOI de 10. Pour une injection d'une heure, la souche OST ne semble pas toxique à une MOI de 100 avec la protéine ExoS54. Ces différences de toxicité sont encore plus marquées avec l'injection d'ExoS54-Nanog, puisqu'une toxicité significative est observée à MOI 50 à 3h post-injection, avec 89% et 82% de cellules vivantes pour 1h et 2h d'injection respectivement, alors que la souche Δ uvrAB soumise au traitement photochimique n'induit aucune toxicité avec cette protéine à MOI 200, même avec une injection de 2h.

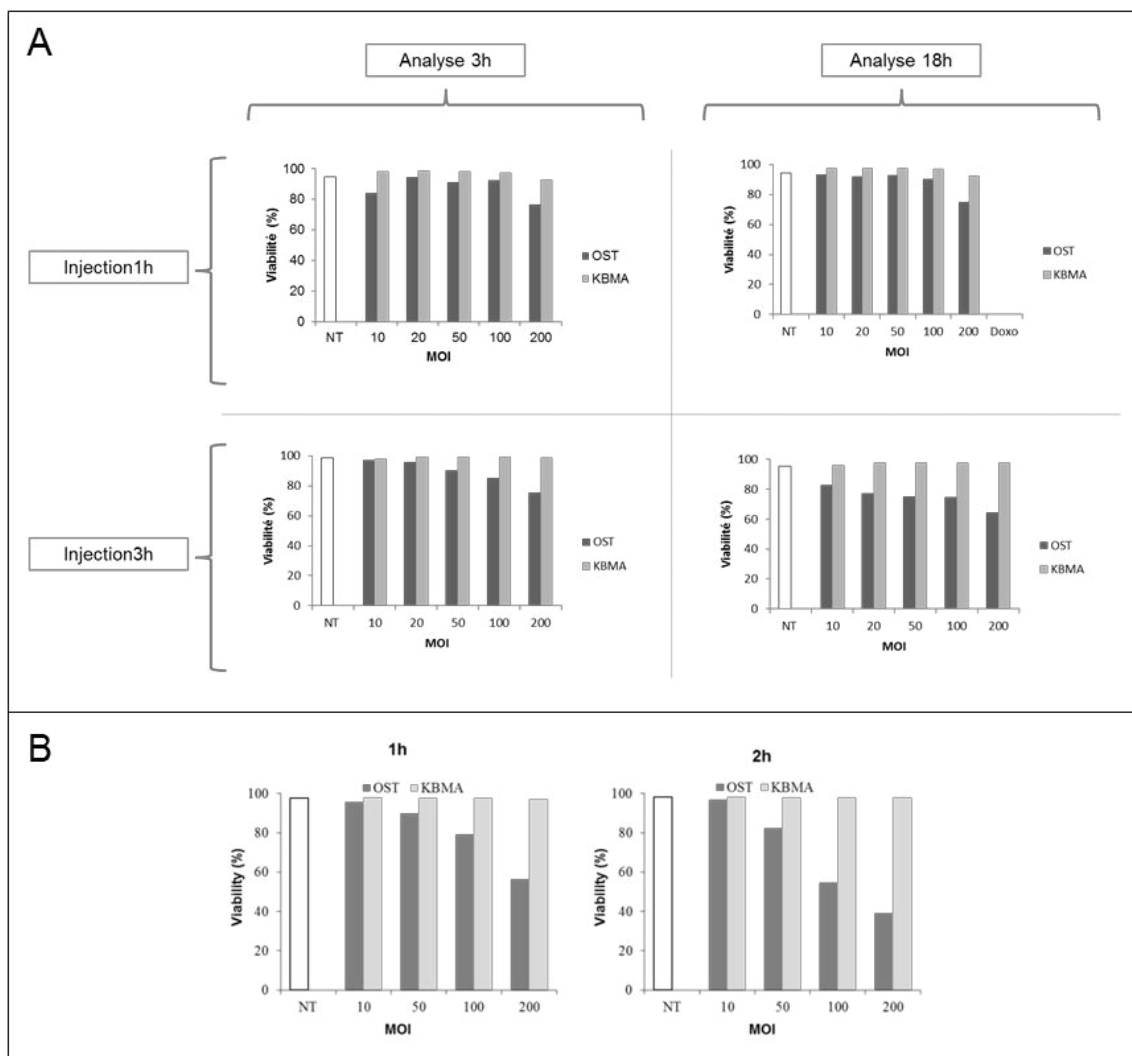


Figure 45. Analyse de l'apport de la technologie KBMA sur la réduction de la toxicité liée à la translocation de protéines via le SST3 au sein de fibroblastes BJ. Les cellules sont réparties en plaque 24 puits à 50 000 cellules par puits la veille de l'injection. Les bactéries, sont ajoutées aux cellules à différentes MOI pendant 1h ou 3h pour l'injection d'ExoS54-Oct4 (A) ou 1h ou 2h pour l'injection d'ExoS54-Nanog (B), à 37°C. La toxicité est évaluée par cytométrie en flux, à 3h ou 18h après la fin de l'injection, après transfert des cellules en tubes de cytométrie et ajout d'une solution d'Annexin V-APC et de 7-AAD. Des contrôles négatifs (NT) et positif (Doxorubicine 10 μ M, doxo) de toxicité sont réalisés.

Ces résultats sont en accord avec nos observations préliminaires et indiquent que la souche OST-ΔuvrAB représente une très bonne alternative à la souche OST, dans l'optique de réduire la toxicité du vecteur. Toutefois, la souche OST, même utilisée avec des facteurs très actifs d'un point de vue transcriptionnel, ne présente pas de toxicité apparente, à MOI 10 pour Nanog et jusqu'à MOI 100 pour Oct4.

ii. La toxicité est liée à la protéine injectée

Lors de nos expériences de cytométrie et de qPCR, nous utilisons les protéines Bla et Ova couplées à ExoS54, respectivement comme outils de mesure d'efficacité de vectorisation et comme contrôle négatif d'induction transcriptionnelle. Ces deux protéines, mêmes utilisées à une forte MOI, n'induisent a priori pas de mort cellulaire. Nous avons émis l'hypothèse que la toxicité du SST3 n'était pas liée à la translocation en elle-même mais à l'activité intracellulaire des protéines une fois injectées.

Afin de valider cette hypothèse, nous avons vectorisé via le SST3 de la souche OST, différentes protéines couplées à ExoS54 au sein de fibroblastes BJ, et évalué la toxicité associée à chacune d'entre elles. Nous avons choisi d'utiliser Oct4 et Nanog car nous savons qu'ils induisent une mort cellulaire non négligeable, et Bla, a priori non toxique (Figure 46).

Alors que Bla n'est absolument pas toxique, même à très forte MOI, nous observons une diminution conséquente de la viabilité pour les deux facteurs de transcription en fonction de la MOI, en particulier pour Nanog. En effet, la toxicité peut être estimée à plus de 20% à une MOI de 100 et à plus de 40% à une MOI de 200. Des mesures de viabilité réalisées après l'injection d'ExoS54-Ova présentent un profil proche celui de l'injection d'ExoS54-Bla (données non montrées).

Ces résultats ont été confirmés par une analyse en microscopie optique (Figure 47). Alors que l'injection d'ExoS54-Ova n'induit aucun changement de morphologie, l'injection d'ExoS54-Oct4 et surtout ExoS54-Nanog est responsable d'une modification importante, avec un rétrécissement et une diminution du volume cellulaire. Ces changements sont notamment observés chez les cellules en apoptose. L'injection de Sox2 et Lin28a couplés à ExoS54 n'induit qu'un changement morphologique très modéré.

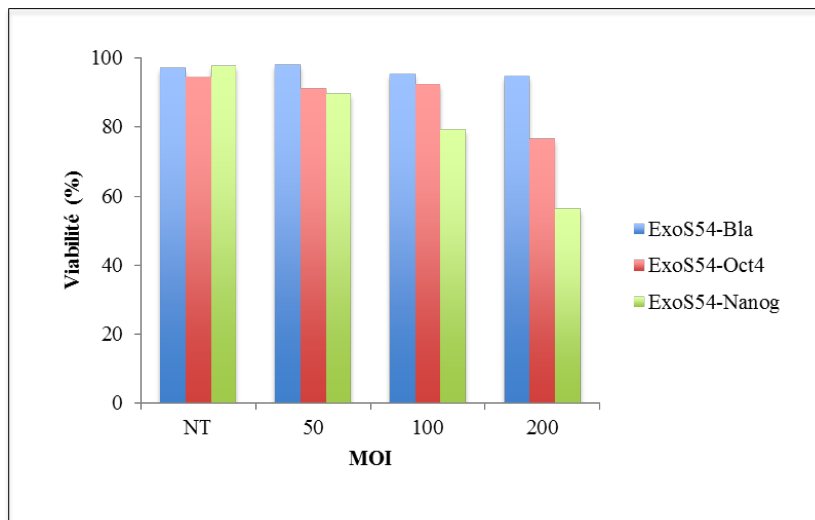


Figure 46. Influence de la protéine injectée sur la toxicité du processus de translocation par le SST3. Trois protéines différentes (Bla, Nanog ou Oct4) couplées à ExoS54 sont injectées au sein de fibroblastes pendant 1h à 37°C à différentes MOI avec la souche OST. Après injection, les cellules sont lavées 2 fois avec du DPBS et mises en culture en milieu DMEM-10%SVF avec antibiotiques (gentamicine et ciprofloxacine à 20 µg/ml). Les analyses de viabilité sont réalisées 3h post-injection, par cytométrie en flux, par mesure de l'incorporation de 7-AAD et d'Annexine-V. Les cellules 7-AAD-/Annexin-V⁻ sont considérées vivantes. Un contrôle positif de viabilité est réalisée avec des cellules n'ayant pas été mises en contact de la bactérie (NT).

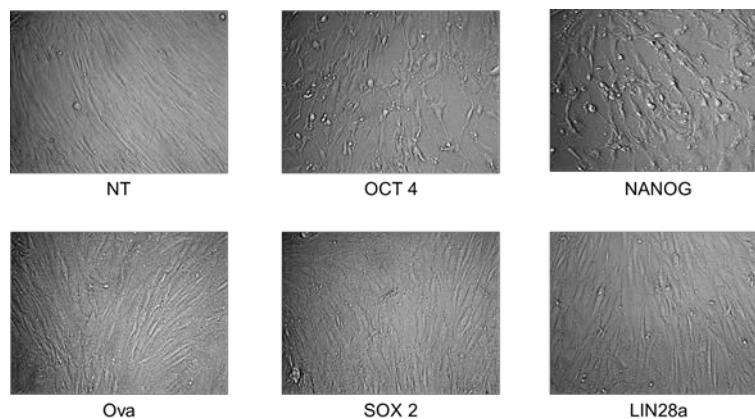


Figure 47. Analyse par microscopie optique des fibroblastes BJ après injection de différentes protéines via le SST3. Les cellules sont analysées 24h après injection des différentes protéines, à MOI 50. Grossissement : X220. NT : cellules non traitées avec *P. aeruginosa*.

Nous avons également validé notre hypothèse par une détection de l'activité Bla en parallèle d'une mesure de viabilité, 3h après la fin d'une injection de 3h (Figure 48). En effet, nous pouvons voir que la grande majorité des cellules injectées par la souche OST, même à forte MOI, sont toujours vivantes. Le même profil est observé à 18h.

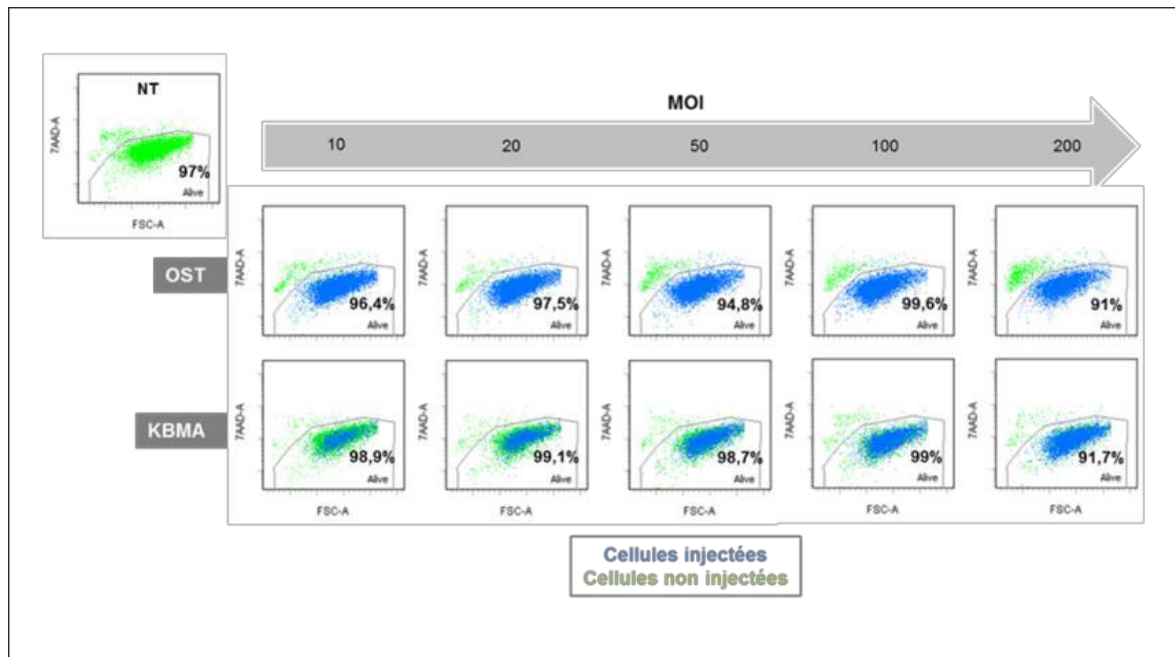


Figure 48. Estimation de la proportion de cellules injectées parmi les cellules vivantes. ExoS54-Bla est injectée pendant 3h à différentes MOI par la souche OST ou OST- Δ uvrAB après traitement KBMA conventionnel. Les analyses sont réalisées après ajout de CCF2 et 7-AAD, 3h après la fin de l'injection. Un contrôle avec des cellules non traitées (NT) a été réalisé. Le pourcentage de cellules vivantes est indiqué dans le cadre "alive".

Ces résultats sont extrêmement importants puisqu'ils indiquent que la toxicité observée avec le SST3 est principalement liée à l'activité des facteurs une fois à l'intérieur des cellules cibles, et non pas au processus de translocation ni aux autres facteurs de virulence. Il reste désormais à vérifier que la non-toxicité de la souche OST- Δ uvrAB atténuée ne soit tout simplement pas liée à une diminution de l'efficacité de translocation et donc à une diminution de l'activation de la transcription des gènes de pluripotence.

2. Paramètre n°2 : Efficacité de vectorisation

Le traitement KBMA est une technologie très intéressante permettant de réduire complètement la toxicité cellulaire directement associée à la translocation via le SST3. Il reste néanmoins à s'assurer que cette réduction de toxicité n'est pas associée à une perte importante de l'efficacité de translocation intracellulaire de protéines. Les efficacités de vectorisation relatives entre la souche OST et la souche OST- Δ uvrAB atténuée ont été évaluées sur les fibroblastes BJ grâce à l'utilisation de la protéine rapportrice ExoS54-Bla (Figure 49A).

Une différence importante d'efficacité d'injection est observée entre les souches OST et OST- Δ uvrAB traitée selon le protocole KBMA. La souche OST est beaucoup plus efficace à MOI égale, y compris lorsqu'on compare une injection de 3h avec le protocole KBMA et une injection d'une heure par OST. A 3h post-injection, le pourcentage de cellules injectées est d'environ 70% avec une MFI d'environ 6000 à une MOI de 10 avec la souche OST ; il faut utiliser une MOI de 200 après traitement KBMA pour obtenir un pourcentage équivalent avec une MFI plus faible, aux alentours de 5000, et ce, après 1h ou 3h d'injection. A 18h post-injection, ces différences d'efficacité sont encore plus marquées ; tandis qu'il persiste une activité Bla résiduelle importante avec la souche OST (jusqu'à 80% de cellules positives, bien que la MFI soit réduite) les cellules injectées avec la souche OST- Δ uvrAB irradiée ne présentent plus aucune activité. En prenant en compte toutes les MOI, la MFI mesurée à 3h est environ 11 fois supérieure à celle mesurée à 18h, suggérant que la quantité de protéines injectées a diminué d'un facteur 11.

L'efficacité avec la souche OST n'a pas été évaluée pour une injection de 3h, étant donné que ces conditions génèrent une toxicité importante due aux facteurs de transcription, même à MOI modérée.

La réduction de la concentration en amotosalène, normalement utilisé à 10 μ M lors du traitement photochimique, n'a aucune influence sur l'efficacité de translocation par la souche OST- Δ uvrAB irradiée (Figure 49B).

Ces données suggèrent que contrairement à ce que nous avons observé en microscopie confocale, les protéines injectées par le SST3 sont toujours présentes au sein des cellules cibles à 18h post-injection, mais à une concentration beaucoup plus faible. Cette observation contradictoire peut sans doute s'expliquer par l'utilisation de différentes méthodes de détection ; en effet, l'utilisation du substrat fluorigène pour Bla induit une amplification du signal importante à partir d'une quantité relativement faible d'enzyme, qu'il n'est sans doute pas possible de détecter par immunomarquage.

En résumé, la souche OST possède un pouvoir de vectorisation largement supérieur à celui de la souche OST- Δ uvrAB irradiée. La différence de toxicité observée précédemment entre les deux souches peut donc s'expliquer, en grande partie, par la différence d'efficacité de translocation observée et donc à une concentration intracellulaire en facteurs de transcription exogènes beaucoup plus faible avec le SST3 de la souche atténuée.

Il est important de noter que la protéine d'intérêt acheminée par le SST3 est toujours présente au sein des cellules cibles le lendemain de l'injection. Cette dernière information est très intéressante puisqu'elle permet d'envisager une injection des facteurs toutes les 48h et non pas tous les jours, ce qui permet certainement de limiter la manipulation des cellules à reprogrammer et renforce également le caractère pratique du vecteur.

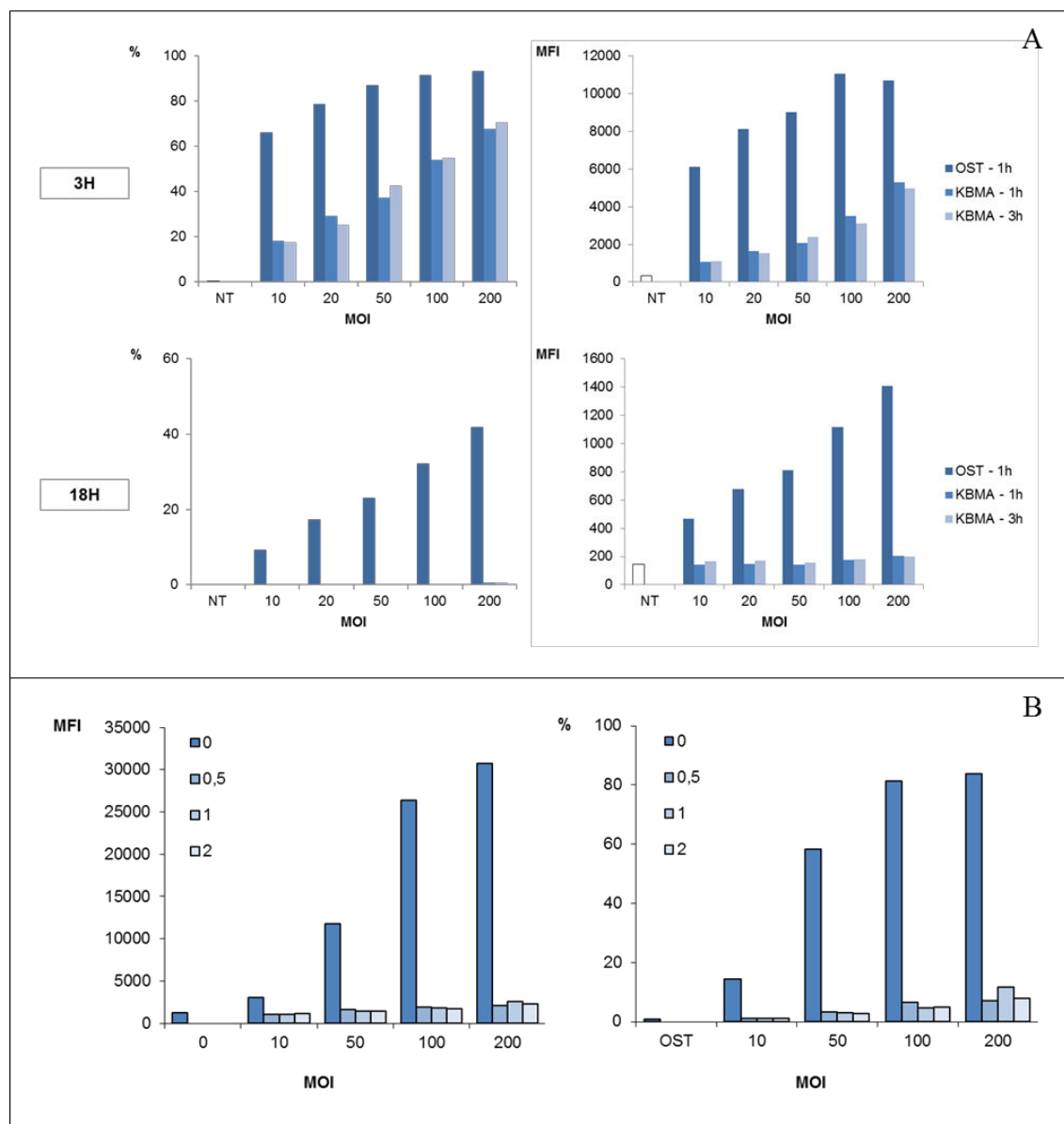


Figure 49. Influence du traitement photochimique KBMA sur la translocation de protéines recombinantes par le SST3 au sein de fibroblastes BJ. Le protocole est identique à celui réalisé pour l'analyse de toxicité avec ExoS54-Oct4 et Nanog (Figure 45). Ici, c'est ExoS54-Bla qui est injectée pendant 1h à différentes MOI par la souche OST ou OST-ΔuvrAB après traitement KBMA conventionnel (A) ou en réduisant la concentration en amotosalène (B) (0 = OST, 0,5 μ M, 1 μ M et 2 μ M). Les analyses sont réalisées à 3h ou 18h après injection, par mesure du pourcentage de cellules présentant une activité Bla.

3. Paramètre n°3 : Activité transcriptionnelle

Nous venons de mettre en évidence une différence d'efficacité de vectorisation considérable en faveur du SST3 porté par la souche OST, conduisant à une toxicité liée au facteurs de transcription injectés en quantité plus importante.

Afin de déterminer l'influence de cette toxicité et de valider un protocole pour la reprogrammation, nous avons décidé de comparer les deux souches sur leur capacité à induire la transcription des gènes de pluripotence. A cette fin, les trois facteurs centraux, Oct4, Sox2 et Nanog ont été injectés simultanément par les deux souches, à une MOI de 20 et de 200 pour chaque facteur, pour OST et OST- Δ uvrAB atténuée, respectivement. Les variations du niveau de chaque transcrit ont été évaluées par qPCR, par rapport à l'injection d'ExoS54-Ova (Figure 50).

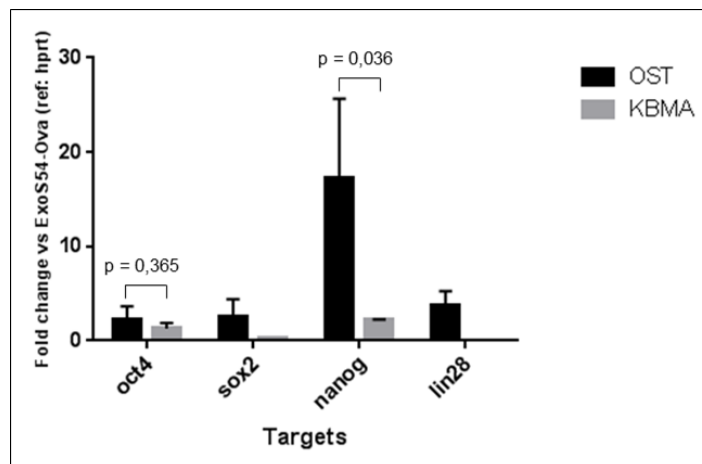


Figure 50. Influence du traitement photochimique KBMA sur l'activation transcriptionnelle des gènes de pluripotence induite par le SST3 au sein de fibroblastes BJ. Les cellules sontensemencées à 50 000 cellules par puits en plaques 6 puits, 72h avant la première injection. Trois injections des trois facteurs Oct4, Sox2 et Nanog sont réalisées à MOI 20 pour chaque facteur avec la souche OST et 200 pour la souche OST- Δ uvrAB irradiée. Un contrôle est réalisé avec l'injection de la protéine ExoS54-Ova. Les cellules sont lysées et les ARN purifiés 24h après la troisième injection. Les gènes cibles *oct4*, *sox2*, *nanog* et *lin28* sont utilisés comme cibles en qPCR, avec *hprt* comme gène de référence. Les mesures ont été effectuées en triplicat. Les "p-values" ont été déterminées à l'aide d'un test t de Student.

Les réponses observées sont très différentes selon les gènes cibles. Premièrement, avec le traitement KBMA, nous avons pu obtenir un niveau de transcrit significativement différent du bruit de fond pour seulement deux des quatre cibles, à savoir *oct4* et *nanog*, ce qui

signifie que la variation de l'expression de *sox2* et *lin28a* peut être considérée comme nulle avec ce protocole. Nous remarquons que l'induction de l'expression de *nanog* est beaucoup plus forte avec la souche OST, avec une augmentation d'un facteur 17,25 contre 2,2 pour le protocole KBMA ($p < 0,05$) ; en revanche la différence est moins marquée au niveau de l'expression d'*oct4*, deux fois plus forte avec OST. Nous observons également une activation de l'expression des gènes *sox2* et *lin28* avec la souche OST, d'un facteur 2,6 et 3,8 respectivement, par rapport au contrôle ExoS54-Ova.

Nous remarquons que les niveaux d'activation sont globalement plus faibles que ceux obtenus précédemment lors de la preuve de concept avec l'injection des facteurs de transcription de manière individuelle (Figure 43). Cette différence peut sans doute s'expliquer par le fait que la MOI utilisée lors de la première expérience était cinq fois plus élevée pour un facteur donné et que les injections étaient réalisées toutes les 24h, conduisant certainement à une induction plus forte.

Ces données, complémentaires des résultats des tests de toxicité et d'efficacité de vectorisation, vont dans le même sens et nous indiquent que la souche OST est la plus pertinente dans l'optique d'utiliser le SST3 comme outil de reprogrammation cellulaire.

En effet, la souche ΔuvrAB traitée avec le protocole KBMA, ne conduit qu'à une activation extrêmement modérée des gènes cibles de pluripotence. Au contraire, l'injection des facteurs avec la souche OST conduit à une activation transcriptionnelle importante, et ce dès 24h comme observé précédemment.

Le KBMA est une technologie extrêmement novatrice et efficace pour la vectorisation de peptides antigéniques à visée anti tumorale. Grâce à ce procédé, l'équipe TheREx est parvenue à induire, chez la souris, une réponse immunitaire cellulaire efficace, avec une amplification de lymphocyte T CD8⁺ spécifiques d'un antigène tumoral (Le Gouëllec *et al.*, 2013). En revanche, l'efficacité de translocation est très réduite par ce procédé, et nous pouvons imaginer que la quantité de facteurs de transcription requise pour induire la mise en place du réseau de pluripotence est très certainement supérieure à la quantité de peptides nécessaires pour activer des cellules dendritiques dans le cadre d'une réponse immunitaire.

A la suite de ces observations et des résultats obtenus, nous avons donc sélectionné la souche OST pour réaliser nos expériences de génération des cellules pluripotentes.

4. Elimination de la bactérie après injection des facteurs de transcription

Nous avons sélectionné le SST3 de la souche de *P. aeruginosa* OST comme vecteur optimal, en termes d'efficacité de vectorisation et d'induction transcriptionnelle, dans l'optique de reprogrammer des cellules somatiques en iPS. La souche OST, contrairement à la souche OST- Δ uvrAB soumise au traitement photochimique KBMA, est capable de se diviser et donc de se disséminer. Il est donc essentiel de réussir à éliminer rapidement et durablement des bactéries après l'étape d'injection.

Pour cela, nous avons mis au point un protocole au cours duquel les cellules sont remises en culture, après injection, dans un milieu contenant deux antibiotiques : de la gentamicine à 20 μ g/ml et de la ciprofloxacine à 20 μ g/ml. Cette combinaison d'antibiotiques est très judicieuse puisqu'elle permet à la fois d'agir sur la synthèse protéique mais aussi sur la réplication du génome bactérien. La gentamicine, de la famille des aminoglycosides, inhibe la sous-unité 30S du ribosome bactérien ; la ciprofloxacine est une fluoroquinolone de seconde génération, agissant en inhibant l'ADN gyrase.

Afin d'étudier l'efficacité du traitement, nous avons cherché à vérifier l'absence de bactéries et de matériel génétique de la bactérie, dans le milieu de culture des cellules mais aussi à l'intérieur des cellules. Pour cela, nous avons utilisé deux méthodes d'analyse sur une culture de fibroblastes BJ ayant reçu plusieurs injections de facteurs de transcription par la souche OST : (i) pour vérifier la présence ou non de bactéries, un étalement a été réalisé sur une gélose de PIA, milieu contenant un agent antimicrobien, l'Irgasan®, sur laquelle seules les espèces *P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P. fluorescens* peuvent pousser ; (ii) afin de détecter la présence de matériel génétique issu de la bactérie, nous avons réalisé une amplification par PCR d'un élément du génome bactérien, en l'occurrence *kynA* codant la Kynurenine Aminotransférase impliquée dans le métabolisme du tryptophane. Nous avons également amplifié une partie du plasmide pEAI (régions flanquants pExsA d'un côté et le MCS de l'autre). Les étalements ont été réalisés à 24h et 48h après ajout des antibiotiques, les amplifications par PCR ainsi que de nouveaux étalements ont été réalisés 7 jours après le retrait des antibiotiques (Figure 51).

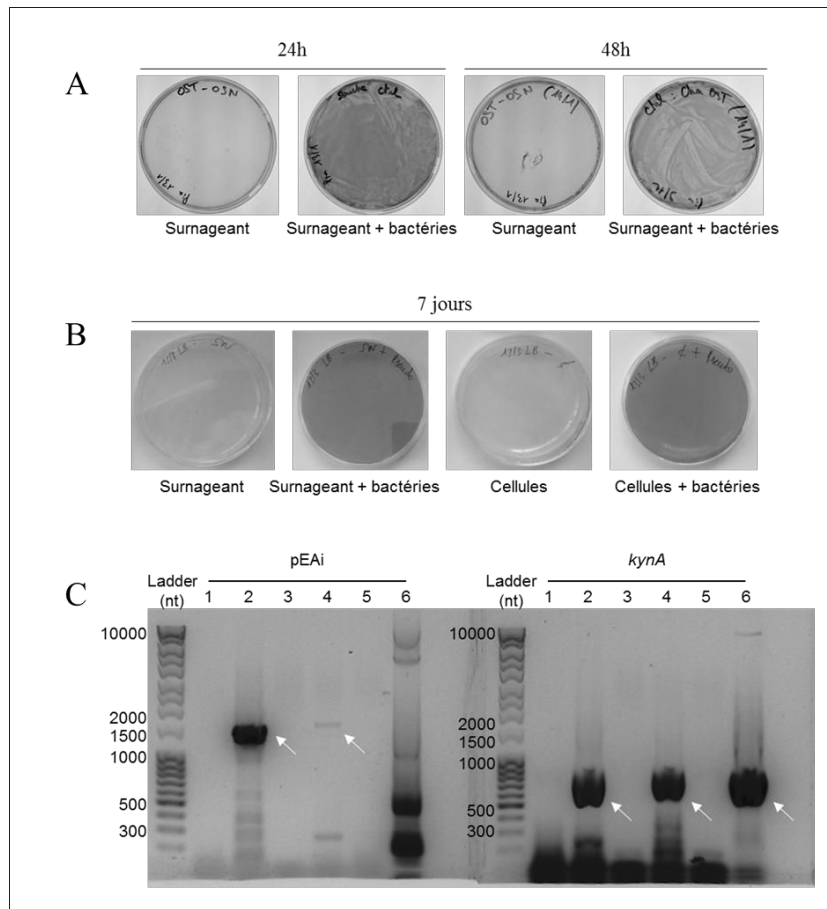


Figure 51. Analyse de l'efficacité du traitement antibiotique dans l'élimination de *P. aeruginosa* des cultures de fibroblastes BJ. (A) Des étalements des surnageants de culture de fibroblastes BJ sur gélose de PIA sont réalisés 24h et 48h après 2 injections par la souche OST des facteurs Oct4, Sox2 et Nanog espacées de 48h, à MOI 20 par facteur. Des contrôles positifs sont réalisés par étalement d'une culture de la souche OST diluée 100 fois dans les surnageants de culture (surnageant + bactéries). (B) Les surnageants de culture et les cellules sont étalés sur gélose de PIA 7 jours après retrait des antibiotiques, suite à 5 injections des facteurs Oct4, Sox2, Nanog, Lin28a et c-Myc par la souche OST, à MOI 20 par facteur, espacées de 48h. Des contrôles positifs sont réalisés par étalement d'une culture de la souche OST diluée 100 fois dans les surnageants de culture (surnageant + bactéries) ou avec les cellules (cellules + bactéries). (C) Les amplifications par PCR sont réalisées sur les mêmes échantillons qu'en B : surnageant (1), surnageant + bactéries (2), cellules (3), cellules + bactéries (4) ; avec deux contrôles supplémentaires pour la réaction d'amplification : un contrôle négatif réalisé avec du milieu de culture des cellules (5) et un contrôle positif réalisé avec un plasmide purifié portant la séquence à amplifier (6), à savoir le pEAI-Oct4 (amplicon attendu de 491 nt sans insert, de 1568 nt avec Oct4) ou le pET15b-KynA (amplicon attendu de 867 nt). Pour la PCR, les échantillons sont chauffés pendant 10 min à 95°C pour lyser les cellules puis une centrifugation est réalisée pendant 3 min à 12 000 g afin d'éliminer les débris cellulaires. Les amorces utilisées pour la PCR sont : 5'-GCCAATCCTGATAGGCGATG-3' et 5'-CGACTAACCCAGATGCCGCTG-3' pour le pEAI, 5'-GCCATATGTGTCCTTGCCCTCACTCC-3' et 5'-CCTCGAGCTACAGGTTGGAACGGAGC-3' pour *kynA*. Les flèches blanches indiquent les produits de PCR spécifiques.

Le traitement est extrêmement rapide et efficace puisqu'aucune colonie n'est observée après étalement à 24h comme à 48h après traitement ; au contraire l'étalement d'une culture de la souche OST, même diluée, conduit à l'apparition de nombreuses colonies, formant un

tapis bactérien (Figure 51A). De manière importante, l'effet antibiotique observé est bien bactéricide et durable étant donné qu'une semaine après retrait des antibiotiques, aucune colonie ne peut être isolée, ni dans le milieu de culture des fibroblastes, ni en intra cellulaire (Figure 51B). Non seulement aucune bactérie ne semble avoir survécu, mais plus aucune trace de matériel génétique porté par la bactérie, aussi bien par son génome que par le plasmide pEAI, n'a pu être détectée par PCR (Figure 51C).

Ces résultats sont très importants car ils mettent en évidence le fait qu'il est possible de se débarrasser efficacement et durablement de la souche OST au sein de cultures de cellules eucaryotes, grâce à la combinaison de deux antibiotiques, la gentamycine et la ciprofloxacine. Cette combinaison n'a d'ailleurs démontré aucune toxicité sur les fibroblastes après plusieurs semaines de culture (données non montrées). De plus, aucune insertion de matériel génétique de la bactérie au sein des cellules injectées par le SST3 n'a été détectée. Ce paramètre est très important car nous savons que l'un des problèmes majeurs des vecteurs utilisés classiquement en reprogrammation, utilisant des acides nucléiques, est le risque élevé d'insertion mutagène au sein du génome hôte. Notre vecteur ne semble pas présenter un tel risque.

A travers cette expérience, nous avons démontré que le SST3 était également un vecteur pertinent pour la reprogrammation cellulaire en termes de sécurité.

II. Choix de la combinaison de facteurs de transcription

Le choix des facteurs de transcription est primordial dans le processus de reprogrammation cellulaire. Le cocktail le plus utilisé est celui de Yamanaka, comprenant Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc. Nous avons vu précédemment que la translocation de Klf4 via le SST3 n'était pas possible. En revanche, le vecteur est capable d'acheminer les facteurs de Thomson (Oct4, Sox2, Nanog et Lin28a), déjà utilisés à plusieurs reprises pour générer des iPS. Nous savons également que la combinaison de ces deux cocktails peut favoriser la reprogrammation de cellules difficiles, telles que les cellules sénescents.

Nous avons vu précédemment que le cocktail Oct4, Sox2 et Nanog (OSN), même à une MOI relativement faible (20 par facteur), permettait d'induire efficacement et rapidement l'expression des gènes de pluripotence grâce au SST3. Nous avons donc cherché à vérifier

si l'ajout de c-Myc et de Lin28 à ces trois facteurs centraux, favorisait cette induction transcriptionnelle.

Les 3 facteurs centraux OSN et différentes combinaisons avec Lin28a (OSN+L), c-Myc (OSN+M) ou Lin28a et c-Myc (OSN+L+M) ont été injectés par la souche OST au sein de fibroblastes BJ, à une MOI de 10 pour chaque facteur. Les variations du niveau d'expression des gènes cibles, *oct4*, *sox2* et *nanog*, ont été évaluées par qPCR, par rapport à l'injection d'ExoS54-Ova (Figure 52).

L'influence de l'ajout de Lin28a et/ou c-Myc à OSN sur l'activation transcriptionnelle est comparable d'un gène cible à un autre. Bien que les différences observées entre les combinaisons soient pour la plupart non significatives, nous notons globalement un apport favorable de l'ajout de c-Myc, et de c-Myc plus Lin28a sur la transcription des gènes de pluripotence. En revanche, l'ajout de Lin28a seul à OSN semble au contraire diminuer cette activation transcriptionnelle, ce qui est étonnant, étant donné que Lin28a est connu pour favoriser l'expression de c-Myc. Les variations les plus importantes sont obtenues avec la combinaison des cinq facteurs de transcription OSN+L+M, avec une augmentation d'un facteur 1,26 pour *oct4*, 1,38 pour *sox2* et 1,34 pour *nanog*, par rapport à OSN. Nous notons néanmoins que les variations observées sont relativement faibles, entre 1 et 2 fois pour l'expression d'*oct4* et *nanog*, entre 3 et 4 fois pour *sox2* ; ceci est probablement lié au fait que des MOI faibles ont été employées. De même, les profils de variations transcriptionnelles observés jusqu'à présent avec la combinaison OSN étaient caractérisés par une augmentation particulièrement marquée de l'expression de *nanog* ; ici, c'est l'expression de *sox2* qui est préférentiellement augmentée, avec les différentes combinaisons.

A l'issue de cette expérience, nous avons décidé d'opter pour une combinaison de cinq facteurs de transcription dans l'optique de reprogrammer des cellules somatiques en iPS. Cette combinaison comprenant Oct4, Sox2, Nanog, Lin28a et c-Myc, n'a pour l'instant jamais été décrite pour la reprogrammation cellulaire. Elle semble, dans nos conditions d'utilisation, être plus performante que la combinaison de Thomson (OSNL). Bien qu'elle implique d'utiliser le proto-oncogène c-Myc, le fait de transférer les facteurs directement sous forme de protéines fusionnées à ExoS54 limite le risque d'hyperprolifération cellulaire étant donné que, comme nous l'avons vu précédemment, la dégradation des protéines

injectées est relativement rapide. Cette capacité à contrôler finement l'apport des facteurs exogènes constitue également l'un des atouts de notre vecteur.

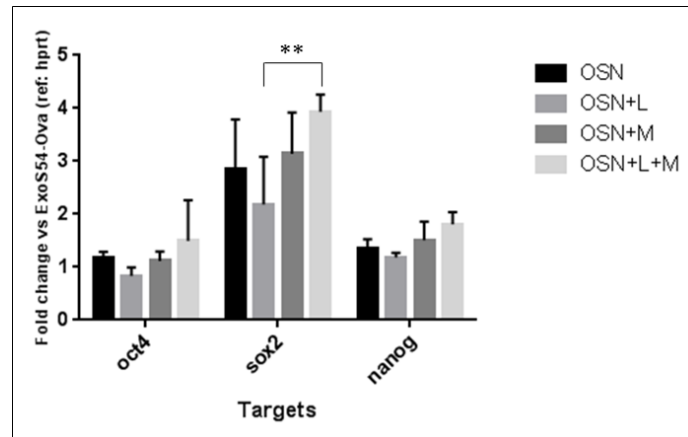


Figure 52. Induction transcriptionnelle des gènes de pluripotence par différentes combinaisons de facteurs de transcriptions vectorisés via le SST3. Les cellules sontensemencées à 50 000 cellules par puits en plaques 6 puits, 72h avant la première injection. Trois injections des différentes combinaisons de facteurs de transcription avec Oct4 + Sox2 + Nanog (OSN), Lin28a (L) et c-Myc (M) sont réalisées à MOI 10 pour chaque facteur avec la souche OST. Un contrôle est réalisé avec l'injection de la protéine ExoS54-Ova à MOI 10. Les cellules sont lysées et les ARN purifiés 24h après la troisième injection. Les gènes cibles *oct4*, *sox2*, *nanog* et *lin28* sont utilisés comme cibles en qPCR, avec *hprt* comme gène de référence. Les mesures ont été effectuées en triplicats. Les "p-values" ont été déterminées à l'aide d'un test Anova d'analyse de variances. Les différences avec une "p-value" < 0,05 sont considérées comme significatives (**).

III. Standardisation du procédé : mise au point d'un protocole de congélation de bactéries prêtes à injecter

Bien que l'injection de facteurs de transcription via le SST3 soit un procédé relativement facile à mettre en œuvre, nous avons souhaité optimiser la facilité d'utilisation du vecteur. Nous avons également cherché un moyen de standardiser le protocole de production couplée à l'injection, afin d'améliorer la reproductibilité de la translocation *in vitro* et de d'anticiper une utilisation du vecteur pour des applications thérapeutiques.

Un protocole de congélation de bactéries, après induction de l'expression de la protéine d'intérêt, a donc été mis au point pour obtenir une préparation directement infectable. La congélation des bactéries juste avant l'injection permet de les mettre en contact directement avec les cellules cibles comme décrit précédemment afin de réaliser la translocation.

D'un point de vue expérimental, après induction de l'expression cytoplasmique de la protéine d'intérêt couplée à ExoS54, les bactéries sont congelées en milieu LB contenant 20% de glycérol. Cette formulation est classiquement utilisée en microbiologie pour la congélation de souches bactériennes. Les lots sont stockés à -80°C jusqu'à utilisation. Le jour de l'injection, les bactéries sont décongelées lentement à 4°C puis ajoutées aux cellules cibles après lavage en milieu de culture adapté. Une preuve de concept a été réalisée avec la souche OST portant le plasmide pEAI-Bla, afin d'évaluer l'influence de ce procédé sur l'efficacité du vecteur sur les fibroblastes BJ. L'activité Bla est analysée au sein de fibroblastes BJ injectés par la bactérie non congelée suivant le protocole habituel ou par la bactérie congelée, à 1 jour ou 10 jours post-congélation (Figure 53).

Vingt-quatre heures après congélation, l'efficacité d'injection de la bactérie congelée, en termes de pourcentage de cellules injectées et d'intensité d'injection, est relativement proche de celle de la bactérie issue d'une culture fraîche. A J+10, les différences sont un peu plus marquées entre les deux bactéries, notamment en termes d'intensité d'injection avec des MFI 2 à 3,5 fois plus fortes pour la bactérie non congelée. Pour ce qui est du pourcentage de cellules injectées, des différences importantes sont observées en faveur du protocole classique pour des faibles MOI tandis qu'ils sont comparables à plus forte MOI.

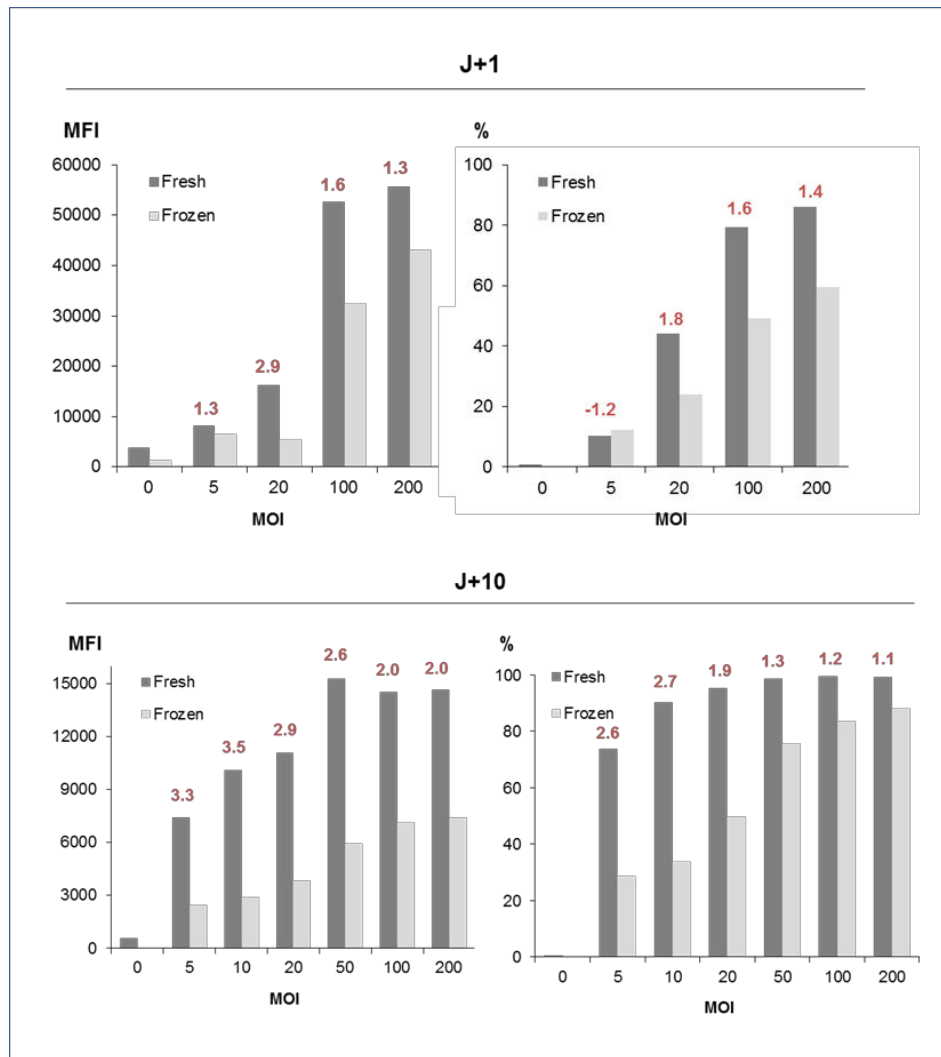


Figure 53. Influence de la congélation de *P. aeruginosa* sur la translocation de protéines par le SST3 au sein de fibroblastes BJ. La souche OST est congelée à -80°C en LB-Glycérol 20% après induction de l'expression d'ExoS54-Bla. Les fibroblastes sont répartis à 50 000 cellules par puits en plaques 24 puits la veille de l'injection. L'injection d'ExoS54-Bla est réalisée pendant 1h à 37°C à 1 jour ou 10 jours après congélation. Un contrôle est réalisé avec la même souche non congelée. L'analyse est réalisée par cytométrie en flux 2h après la fin de l'injection et ajout de CCF2. Légende : "frozen", bactéries congelées ; "fresh", bactéries non congelées (protocole classique) ; le ratio "fresh"/"frozen" des MFI ou des % est indiqué en rouge.

Ce procédé de préparation de bactéries congelées, prêtes à injecter, apparaît comme une stratégie intéressante dans l'optique de standardiser le protocole de reprogrammation de cellules somatiques. En effet l'injection d'une protéine fusionnée à ExoS54 reste efficace, bien que légèrement diminuée, même à 10 jours post-congélation. De plus nous n'avons pas cherché à optimiser les conditions de congélation de la bactérie, notamment en ce qui concerne le milieu de conservation, mais l'optimisation de ce paramètre pourrait sans doute permettre de conserver un SST3 plus actif.

IV. Perspectives pour la reprogrammation cellulaire

Nous avons décidé, au terme de ces différentes expériences, de valider l'utilisation de la souche OST comme vecteur pour la génération d'iPS. Le choix de la souche constitue également un point clé du projet.

Nous avons vu qu'il existait un lien direct entre l'efficacité de translocation, l'activité transcriptionnelle des facteurs injectés et la toxicité induite sur les cellules. La toxicité semble majoritairement induite par l'activité des facteurs de transcription injectés.

Le protocole KBMA est beaucoup moins efficace pour induire une réponse transcriptionnelle spécifique de l'activation des gènes de pluripotence. En revanche il est beaucoup moins toxique, cette diminution de toxicité étant étroitement liée à une efficacité de translocation très réduite. Nous avons décidé de privilégier la forte activité transcriptionnelle associée au transport de facteurs de transcription embryonnaires par le SST3 de la souche OST.

Le succès de la reprogrammation par ce vecteur innovant semble étroitement lié à notre capacité à déterminer l'équilibre existant entre l'efficacité de translocation d'une part et la réduction de la toxicité liée à la translocation et l'activité des facteurs de transcription d'autre part.

Les conditions de reprogrammation devront être finement régulées afin de limiter la toxicité sur les cellules tout en garantissant un effet transcriptionnel suffisant pour induire efficacement la mise en place du réseau de pluripotence.

CHAPITRE 4

Génération sécurisée d'iPS à partir de CSH et de fibroblastes

La dernière partie de ce projet consistait, à partir des conditions déterminées préalablement, à mettre au point un protocole de génération d'iPS à partir de CSH de sang de cordons et de fibroblastes, grâce à l'utilisation du SST3 de *P. aeruginosa* comme vecteur de reprogrammation.

Dans un premier temps, nous avons cherché à vérifier qu'il nous était possible de reprogrammer ces deux types cellulaires mais aussi à développer une expertise dans la génération, la culture et la caractérisation des iPS. Pour cela nous avons utilisé un vecteur viral non intégratif, dérivé du virus Sendai (SeV). Les iPS obtenues grâce à ce système ont ensuite été cultivées à moyen terme puis caractérisées par différentes méthodes : l'analyse morphologique des colonies, la détection de l'activité phosphatase alcaline, la mesure de l'expression de marqueurs spécifiques de la pluripotence, intracellulaires et membranaires.

Au final, nous avons cherché à tirer profits de toutes les optimisations que nous avons réalisées sur le SST3 afin de proposer un protocole innovant non intégratif de génération d'iPS. Différents paramètres ont été ajustés en fonction de nos observations en cours de reprogrammation. Nous avons notamment travaillé sur les conditions de culture, les temps et les fréquences d'injection, les MOI utilisées mais aussi la combinaison de facteurs de transcription.

I. Contrôle : Génération d'iPS grâce à un vecteur dérivé du SeV

Bien que les fibroblastes BJ et les CSH de sang de cordon aient déjà été reprogrammés grâce à différents types de vecteur, nous avons voulu nous assurer que dans nos conditions expérimentales, il nous était également possible de générer des iPS à partir de ces cellules. Nous avons décidé de réaliser, en parallèle de la mise au point de nos vecteurs protéiques, une reprogrammation contrôle à l'aide d'une autre méthode non intégrative efficace. Ceci permettra également de se familiariser avec la culture, mais surtout la dédifférenciation de cellules en iPS, avec toutes les modifications morphologiques et phénotypiques qui y sont associées,

Nous avons décidé d'utiliser un vecteur dérivé du SeV, virus à ARN à réplication cytoplasmique. Des travaux récents ont démontré la possibilité de générer grâce à ce type de vecteur des iPS à partir de CSH CD34⁺ de sang périphérique et de fibroblastes humains (Schlaeger *et al.*, 2014 ; Ye *et al.*, 2013), avec des efficacités de reprogrammation relativement importantes, de 0,12% et 0,077% respectivement. De plus un kit commercial développé par Life Technologies, facile à mettre en œuvre et faisant référence dans la bibliographie, est disponible.

Nous avons également envisagé de générer des iPS par transfert d'ARN messagers (ARNm) codant les différents facteurs de transcription. De la même manière que pour le SeV, nous avons dans un premier temps vérifié que le vecteur était capable de pénétrer au sein des deux types cellulaires d'intérêts et d'induire l'expression des facteurs correspondants. A cette fin, nous avons également utilisé un kit commercial, codant la GFP. Alors qu'un fort signal a pu être observé sur fibroblastes à 48h post-transfection, nous ne sommes jamais parvenus à observer un signal GFP dans les CSH. Ces données sont en accord avec la littérature, puisque la reprogrammation de cellules du sang par des ARN n'a encore jamais été décrite à ce jour.

1. Contrôle de vectorisation et d'expression du SeV au sein de CSH et de fibroblastes

Avant d'entamer une reprogrammation par le SeV, nous avons vérifié que ce vecteur était capable de pénétrer dans nos cellules d'intérêt et que le transgène qu'il portait pouvait effectivement être exprimé. Pour cela nous avons utilisé le kit CytoTune™ EmGFP Sendai Fluorescence Reporter (Life Technologies). Ce vecteur, dérivé du virus Sendai, porte la séquence nucléotidique codant pour la GFP, permettant de détecter facilement par analyse de la fluorescence verte, les cellules dans lesquelles la protéine codée est exprimée.

L'analyse de l'expression de la GFP exprimée grâce au virus SeV a été réalisée sur nos deux types cellulaires d'intérêt, les CSH et les fibroblastes (Figure 54).

Dès 24h après ajout du vecteur portant la séquence de la GFP, nous observons un signal GFP significatif au sein des deux types cellulaires. Alors que le pourcentage de cellules exprimant la GFP est globalement similaire entre les deux types cellulaires, il existe des différences importantes en termes de quantité de protéines exprimées, puisque les MFI obtenues sur les fibroblastes sont largement supérieures à celles obtenues sur les CSH. Nous remarquons également que le signal est beaucoup plus fort à 48h pour les deux types cellulaires, avec une augmentation particulièrement marquée pour les CSH, d'un facteur 16 à MOI 5 alors qu'elle n'est que d'un facteur 3 pour les fibroblastes.

Ces données indiquent que tout comme pour le SST3, la vectorisation de protéines au sein des CSH semble plus difficile que sur des fibroblastes. En effet, la quantité de protéines exprimées grâce au virus SeV paraît nettement supérieure dans les fibroblastes à un instant donné, de plus le vecteur semble s'exprimer plus rapidement au sein de ce type cellulaire.

Nous allons désormais vérifier si ce vecteur nous permet de procéder à la vectorisation des séquences nucléotidiques codant pour les facteurs de transcription embryonnaires.

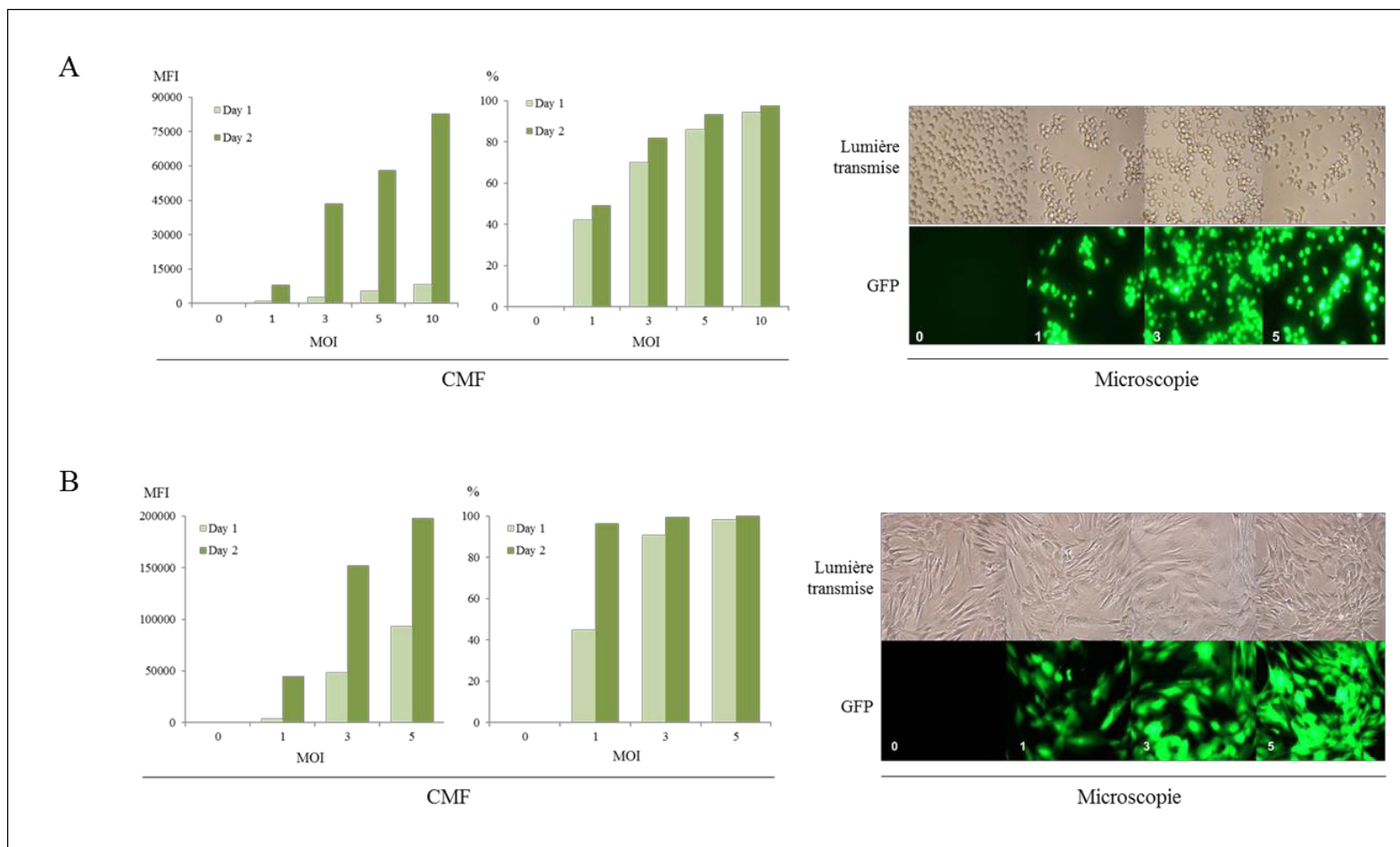


Figure 54. Analyse de l'expression de la GFP au sein de CSH (A) et de fibroblastes BJ (B) après vectorisation de la séquence nucléotidique codante par le virus SeV. Les cellules sont ensemencées en plaque 6 puits à 80% de confluence la veille de la transduction. Le virus est ajouté aux cellules à différentes MOI (1, 3, 5 et 10), selon les recommandations du fournisseur. Un contrôle négatif est réalisé avec des cellules non traitées (0). Les analyses du signal GFP sont réalisées par cytométrie en flux (CMF) et microscopie en fluorescence à 24h (Day 1) et 48h (Day 2). Les photos ont été prises à 48h post-transduction. La MOI est indiquée.

2. Reprogrammation par le virus Sev

Nous venons de voir que le SeV était capable de pénétrer efficacement et de s'exprimer au sein de nos deux types cellulaires d'intérêt. Afin de réaliser la reprogrammation des CSH de sang de cordons et des fibroblastes, nous avons utilisé le kit "CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming" de Life Technologies, permettant l'expression des facteurs de Yamanaka (OSKM). Ce kit comprend 3 vecteurs : un codant pour OSK, un codant pour M et un codant pour K, utilisés simultanément selon un ratio de MOI OSK : M : K de 5 : 5 : 3.

Grâce à ce système nous sommes parvenus à dédifférencier efficacement les deux types cellulaires et avons obtenu des colonies caractéristiques des iPS en 9 jours avec les CSH et 12 jours avec les fibroblastes BJ, bien que des micro-colonies aient pu être détectées dès J+9 (Figure 55). Les colonies ont été maintenues en culture sur 8 passages, soit plus de 60 jours.

Pour les CSH, les délais d'obtention sont plus rapides qu'avec des cellules isolées à partir de sang périphérique puisque les travaux de Ye ont permis de générer des iPS en 13 jours avec ce vecteur (Ye *et al.*, 2013). De manière plus significative, pour les BJ, nous obtenons des colonies deux fois plus rapidement que Schlaeger et ses collaborateurs (Schlaeger *et al.*, 2014). Ceci peut sans doute être attribué au fait que les auteurs ont utilisé des fibroblastes BJ et adultes pour réaliser leur expérience, les temps calculés prenant certainement en compte les cellules adultes et néonatales. Nous remarquons également que bien que le vecteur s'exprime plus faiblement au sein des CSH, l'apparition des colonies est plus rapide avec ces cellules. Ceci peut sans doute s'expliquer par le fait que les CSH sont très immatures et que le niveau de facteurs exogènes requis pour la conversion en iPS est certainement plus faible que pour des cellules différenciées comme les fibroblastes. Ces résultats soulignent ainsi l'influence de l'immaturité des cellules et sont cohérents avec les données de la bibliographie.

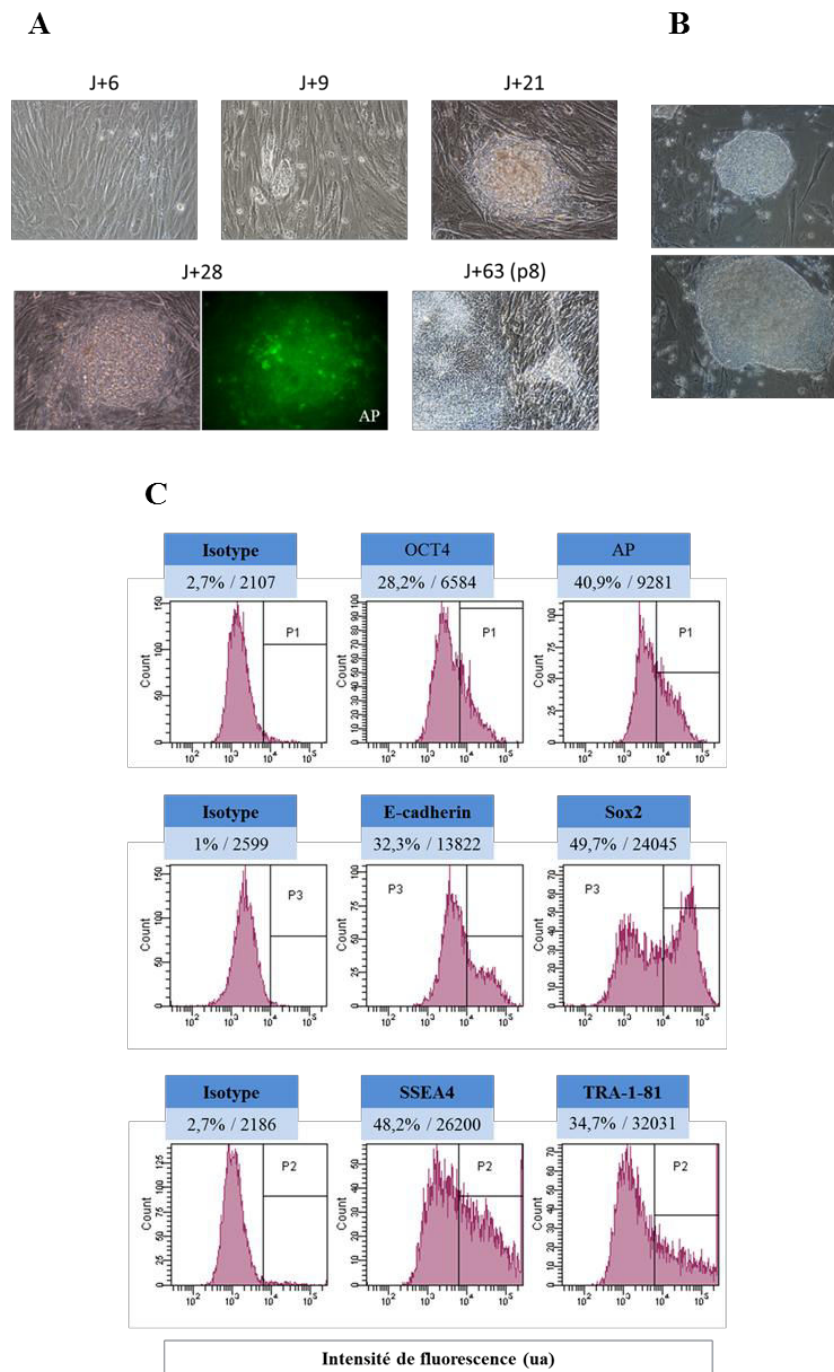


Figure 55. Génération d'iPS par un vecteur dérivé du virus SeV. (A) Chronologie de la reprogrammation des fibroblastes BJ observée par microscopie optique (grossissement : X200). Une détection de l'activité phosphatase alcaline (AP) est réalisée à J+28 par microscopie en fluorescence grâce à l'utilisation d'un substrat fluorigène émettant un signal vert (Filtre FITC) après clivage. (B) Aperçu des colonies obtenues à partir des CSH de sang de cordon à J+13. (C) Analyse par cytométrie en flux des marqueurs de pluripotence des iPS générées à partir des CSH, à J+28. Les différents antigènes sont détectés grâce à l'utilisation d'un anticorps primaire couplé à un fluorochrome. Un contrôle est réalisé pour chaque isotype d'anticorps utilisé. Les cellules en cours de reprogrammation par le kit "CytoTune®-iPS 2.0" (Life Technologies).

A J+28, nous avons réalisé des analyses phénotypiques pour vérifier la pluripotence des cellules. Un marquage de l'activité phosphatase alcaline a été effectué sur les cellules dérivées des fibroblastes (Figure 55A). Nous avons ainsi confirmé que les cellules au sein des colonies exprimaient bien cette enzyme, marqueur caractéristique des cellules pluripotentes. Une analyse plus détaillée de l'expression de différents marqueurs de pluripotence a été réalisée sur les cellules dérivées des fibroblastes (Figure 55C). Bien que tous les marqueurs soient exprimés, nous remarquons que seule une partie des cellules exprime chacun des marqueurs. Plusieurs hypothèses peuvent être associées à ce résultat : (i) la population d'iPS est peut-être hétérogène, comprenant des cellules partiellement reprogrammées n'exprimant pas tous les marqueurs ; (ii) il se produit une différenciation des cellules pluripotentes générées, associée à une perte des marqueurs de pluripotence.

Bien que nous ne puissions pas écarter la première hypothèse, une différenciation spontanée des cellules a pu être mise en avant. En effet, dès J+28, nous observons une modification de la morphologie de certaines colonies, avec des bords moins marqués et un allongement des cellules en périphérie, adoptant une morphologie de fibroblastes. A J+63, une différenciation ectodermique marquée est observée avec l'apparition de cellules en forme de neurone mais aussi de structures multicellulaires ressemblant à des rosettes neurales (Figure 55A). La différenciation observée peut également être attribuée à la méthode de dissociation enzymatique des iPS, connue pour générer des anomalies caryotypiques à une fréquence relativement élevée par rapport à une dissociation mécanique. Ceci conduit à l'amplification de colonies hétérogènes en terme de taille et de phénotype (Buzzard *et al.*, 2004 ; Oh *et al.*, 2005).

Malgré l'existence de nombreuses autres méthodes permettant la caractérisation des iPS, nous n'avons pas accentué d'avantage l'analyse des cellules pluripotentes obtenues.

A travers cette expérience, nous avons mis en évidence, dans nos conditions expérimentales, la possibilité de reprogrammer nos deux types cellulaires en iPS grâce à l'utilisation d'un vecteur non intégratif.

II. Essai de reprogrammation par le SST3

Après avoir mis en avant la possibilité de générer des iPS à partir de fibroblastes et de CSH de sang de cordon humain grâce à l'utilisation d'un vecteur non intégratif, nous avons cherché à mettre au point un protocole de reprogrammation de ces cellules grâce au SST3 de *P. aeruginosa*.

1. Fibroblastes

Les résultats obtenus précédemment sur le développement de conditions d'utilisation optimales du SST3 ont servi de base pour initier ces nouvelles expériences Tableau 21.

Tableau 21. Liste des essais de reprogrammation réalisés avec le SST3 sur des fibroblastes dermiques néonataux. Les paramètres modifiés sont surlignés en bleu.

	Expériences de Reprogrammation					
	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5	N°6
Cellules	BJ	BJ	BJ	BJ	HNDF	HNDF
VPA	Ø	Ø	125 µM	Ø	250 µM	250 µM
Sérum (injection)	Ø	Ø	Ø	1% SVF	1% SVF	1% SVF
Facteurs exogènes	OSNLM	OSM et OSNL	OSM et OSNL	OSNLM	OSNLM	OSNLM
Centrifugation	10 min - 800 g	10 min - 800 g	10 min - 800 g	Ø	Ø	Ø
Durée de l'injection	1h	1h	1h	2h30	1h30	1h30
Nombre d'injections	5	4	4	1	2	5
Fréquence	48h (1 à 3) puis 72h et 96h	72h	72h	-	72h	48h (1 à 3) puis 6j (3 à 5)
MOI par facteur	10 (5 pour injection n°5)	10 (OSNL) ou 20 (OSM)	10 (OSNL) ou 20 (OSM)	10	10 (OSLM) et 5 (N)	2,5 (OSLM) et 1,25 (N)
Passage sur MEF	J+11	J+10	J+10	-	-	J+18
Observations	Aucune colonie générée	Cellules mortes à J+14	Cellules mortes à J+14	Cellules mortes à J+2	Cellules mortes à J+7	Cellules mortes à J+22

La première expérience réalisée intègre tous les paramètres déterminés comme optimaux, à savoir : la combinaison des cinq facteurs de transcription, une injection toutes les 48h à une

MOI de 10 pour chaque facteur afin de limiter la toxicité associée à l'activité des protéines injectées et notamment de Nanog, une centrifugation de la co-culture et l'absence de sérum pour favoriser l'injection. Nous ne sommes néanmoins pas parvenus à générer des cellules pluripotente par ce protocole.

Au cours des expériences suivantes, nous avons donc cherché à optimiser les paramètres de reprogrammation par notre vecteur. Nous avons ainsi développé différentes approches, en faisant varier la combinaison des facteurs utilisés, la fréquence des injections de même que l'utilisation d'acide valproïque pour faciliter l'accès des facteurs de transcription à leurs cibles. Néanmoins, tous les protocoles employés ont conduit à une mort cellulaire rapide, y compris en retirant l'étape de centrifugation du protocole pour éviter cette contrainte mécanique répétée aux cellules ou en maintenant une certaine activité proliférative en ajoutant du SVF au cours de l'étape d'injection.

La source de cellules a également dû être changée pour cause d'arrêt de commercialisation des fibroblastes BJ. Nous avons choisi d'utiliser des fibroblastes HNDF à passage 4. Bien qu'il s'agisse exactement du même type cellulaire, le nombre de passages plus faible permet de réduire le risque d'altérations génomiques, potentiellement réfractaires à la reprogrammation. Les expériences réalisées à partir de ces cellules ont également débouché sur une mort rapide, y compris en réduisant considérablement les MOI utilisées, jusqu'à 1,25 pour Nanog.

Cette mort cellulaire semble liée à des injections répétées à MOI modérée et faible ou à une injection plus longue. Bien que nous ayons réalisé un réajustement des paramètres par rapport à ce que nous avons déterminé précédemment, de nouvelles optimisations sont à prévoir, en particulier en ce qui concerne les fréquences d'injection ou en réduisant encore les MOI utilisées. Nous pouvons par exemple imaginer de réaliser une injection hebdomadaire à MOI élevée ou une injection quotidienne à une MOI très réduite. Par ailleurs, ces fibroblastes néonataux, et en particulier les HNDF à passage 4, semblent extrêmement fragiles vis-à-vis de la translocation et de l'activité des facteurs de transcription. Il pourrait être intéressant d'utiliser des fibroblastes adultes, d'autant plus que l'objectif final du projet est de différencier des cellules adultes.

2. CSH de sang de cordon

Des essais de reprogrammation des CSH CD34⁺ purifiées à partir de sang de cordon ombilical ont également été initiés. Un résumé des différentes expériences réalisées est présenté dans le Tableau 22.

Tableau 22. Liste des essais de reprogrammation réalisés avec le SST3 sur des CSH de sang de cordon.
Les paramètres modifiés sont indiqués en rouge.

Schéma N°	Facteurs utilisés	MOI par facteur	Temps d'injection	Nombre d'injections	Fréquence des injections	Additif	Passage / MEF
1	2 (OS)	50	1h	7	24h	VPA 125 µM	J+7
2	2 (OS)	50	1h	8	24h	VPA 125 µM	J+8
3	4 (OSNL)	100	1h	7	24h	VPA 125 µM	J+7
4	4 (OSMN)	50	1h	9	24h	VPA 125 µM	J+9

Malgré plusieurs essais réalisés et la mise en œuvre de différentes combinaisons de facteurs de transcription appliquées au cours d'injections quotidiennes, nous ne sommes pas parvenus à générer des iPS à partir de CSH de sang de cordon, grâce au SST3. Nous observons néanmoins une toxicité réduite par rapport à celle induite sur les fibroblastes. Nous sommes notamment parvenus à maintenir les cellules traitées selon pendant plus de 5 semaines, y compris avec le schéma N°4, avec l'utilisation de la bactérie de manière quotidienne à une MOI cumulée de 400, pendant 5 semaines. Cette toxicité réduite peut sans doute être attribuée au fait que les CSH sont moins permissives à la translocation de protéines via le SST3 que les fibroblastes.

En résumé, à ce jour, le SST3 de *P. aeruginosa* ne nous a pas permis de reprogrammer des fibroblastes et des CSH de sang de cordon. Sur les fibroblastes, le SST3 permet une translocation très efficace des facteurs de transcription, adressés rapidement jusqu'au noyau et capables d'induire une activation rapide des gènes cibles de pluripotence. Néanmoins, ces facteurs de transcription sont responsables d'une toxicité considérable, véritable frein à la reprogrammation cellulaire. Au contraire, les CSH sont moins "permissives" à la translocation, la quantité de facteurs de transcription exogènes vectorisés étant insuffisante à la progression du processus de reprogrammation. Il nous faut désormais identifier de nouvelles pistes d'optimisation afin de pouvoir exploiter pleinement le potentiel du SST3 en reprogrammation cellulaire.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Discussion générale

La première étape de ce projet a consisté à comparer les différents vecteurs de protéines développés par l'équipe TheREx, comme outils potentiels de reprogrammation cellulaire. Pour cela nous avons pris en compte différents critères : (i) l'efficacité de production et de purification ; (ii) la difficulté de mise en place du protocole, de l'expression de la protéine jusqu'aux expériences de transfert intracellulaire ; (iii) l'influence de la séquence de vectorisation sur l'affinité des facteurs de transcription à leurs cibles ; (iv) la capacité du vecteur à pénétrer au sein des cellules d'intérêt et à transporter des protéines cargo.

Nous avons sélectionné le SST3 de la souche OST de *P. aeruginosa*, correspondant à une micro-seringue naturelle capable d'injecter des protéines d'intérêt directement dans le cytoplasme des cellules cibles. Ce système de vectorisation possède plusieurs avantages. Tout d'abord, il est très facile à mettre en œuvre et ne requière aucune étape de purification. D'autre part, le SST3 est capable de transporter efficacement les facteurs de Thomson (OSNL) mais aussi c-Myc, dans différents types cellulaires tels que les fibroblastes ou les CSH de sang de cordon, soit nos deux sources cellulaires d'intérêt pour la génération d'iPS. De plus, la séquence signal ExoS54 permettant la translocation via le SST3, semble favoriser l'interaction entre les facteurs de transcription et leur séquence cible ; au contraire, les domaines poly-arginines semblent avoir une influence négative sur cette interaction.

Contrairement aux autres vecteurs de protéines utilisés actuellement pour la reprogrammation cellulaire qui sont pour la plupart des CPP pénétrant principalement par un mécanisme d'endocytose, le SST3 permet une translocation directe des protéines dans le cytoplasme. Ce processus est à l'origine d'un acheminement rapide des facteurs de transcription exogènes vers le noyau (moins de 2h) et d'une activation relativement forte de l'expression des gènes de pluripotence cibles, de manière comparable à ce qui peut être observé avec un système rétroviral. L'utilisation de la combinaison des cinq facteurs OSNLM permet une activation transcriptionnelle maximale des gènes de pluripotence cibles.

En revanche, la mise en application de cette micro-seringue à la reprogrammation conduit à une cytotoxicité importante sur les fibroblastes, observée lors d'injections répétées des

facteurs de reprogrammation via le SST3. Cette toxicité ne semble pas liée au processus de translocation en lui-même mais plutôt à l'activité de certains facteurs de transcription embryonnaires injectés. Ceci est d'ailleurs cohérent avec le fait que, d'après la littérature, certains de ces facteurs activent l'expression de gènes de la voie apoptotique.

Afin de réduire cette toxicité, nous avons cherché à mettre en œuvre l'utilisation d'un traitement photochimique atténuateur KBMA, permettant d'inhiber la réplication bactérienne mais conservant un SST3 partiellement actif selon les travaux précédents du laboratoire (Le Gouellec et al., 2013). Bien que l'utilisation de cette souche atténuée se soit avérée non toxique pour les cellules, elle ne permet pas d'induire la mise en place du réseau de pluripotence. Nous avons également fait varier différentes conditions dans nos protocoles de reprogrammation, tel que la MOI, le temps d'injection, les conditions de culture. Malgré cela, nous ne sommes à ce jour pas parvenus à générer des iPS grâce à ce vecteur bactérien.

Pour ce qui est de la reprogrammation des CSH de sang de cordon, la toxicité observée est bien plus faible étant donné que ces cellules sont beaucoup plus réfractaires à la translocation. Ceci est donc corrélé à une activation plus modérée du réseau de pluripotence. L'ajout de Klf4 pourrait sans doute favoriser la dédifférenciation des cellules, puisque, comme souligné précédemment, ce facteur est indispensable au cours de la phase d'initiation de la reprogrammation. Malheureusement Klf4 est très mal produit et donc très peu sécrété par le vecteur bactérien, il pourrait donc être intéressant d'utiliser le CPP MD11 ou le Dd pour apporter ce facteur aux cellules dans un protocole combinant différents vecteurs.

Nous allons discuter dans les perspectives des autres pistes potentielles d'optimisation du SST3 pour la reprogrammation cellulaire, en dehors des optimisations possibles déjà discutées dans l'introduction (hypoxie, blocage transitoire de p53, molécules induisant un remodelage épigénétique, ...).

II. Perspectives

1. Pistes d'optimisation

i. Immunité innée et reprogrammation

Récemment il a été montré que l'immunité innée jouait un rôle important dans le processus de reprogrammation (Lee *et al.*, 2012). En effet, Lee et ses collaborateurs ont montré que l'efficacité des vecteurs rétroviraux était en partie liée à leur capacité à activer certaines voies de signalisation, notamment la voie du Toll-Like Receptor 3 (TLR3), conduisant à la mise en place de marques épigénétiques favorables à la reprogrammation. Grâce à une activation du TLR3 par un agoniste chimique, les auteurs sont parvenus à améliorer le processus de reprogrammation non intégratif de fibroblastes humains en iPS grâce à des CPP, d'un facteur 4.

Ces modifications semblent directement liées à l'activation des protéines IRF3 et NF- κ B et à la production d'interféron- β (IFN- β), dont le rôle direct dans le processus de reprogrammation n'a pas été élucidé. Parmi les modifications rencontrées, on trouve une diminution de la marque répressive H3K9me3 au niveau du promoteur du gène *oct4*, mais aussi une inhibition des HDAC et de la DNMT Dot1L, responsable de méthylations activatrices au niveau des promoteurs des gènes somatiques (H3K79me2/me3). NF κ B serait l'effecteur directement impliqué dans le recrutement des enzymes responsables de ces modifications épigénétiques.

P. aeruginosa, par l'intermédiaire de certains de ses facteurs de virulence, est également capable d'induire certaines voies des TLR, en particulier la voie TLR4 via son LPS de surface ou la voie TLR5 via la flagelline, constituant le flagelle. Les voies TLR4, TLR5 et TLR2, sont complexes et conduisent toutes à l'activation de NF- κ B. En outre, la voie TLR4 est également responsable de la production d'IFN β , de manière dépendante de TRIF et IRF3. Nous pouvons ainsi imaginer que la voie TLR4 puisse aussi induire ces modifications épigénétiques favorables à la reprogrammation. En revanche, la flagelline est également responsable de l'activation d'un récepteur intracellulaire de la famille des NLR (NOD-Like Receptor), le NLRC4 (Ceballos-Olvera *et al.*, 2011 ; Matusiak *et al.*, 2015). L'activation du NLRC4 conduit notamment à l'activation de la caspase-1, responsable

d'une mort cellulaire lytique programmée appelée pyroptose (Bergsbaken *et al.*, 2009 ; Miao *et al.*, 2010).

Le blocage transitoire de l'activation de NLRC4 pourrait être une piste intéressante à envisager dans l'optique de favoriser la génération d'iPS. De plus la modulation de cette voie au cours de la reprogrammation pourrait peut-être fournir de nouveaux détails quant aux différents événements moléculaires associés à ce processus de reprogrammation cellulaire. Enfin, nous pourrions également envisager d'utiliser un mutant de la bactérie ne produisant pas de flagelline.

ii. Quorum Sensing

Comme indiqué dans l'introduction, la virulence de la bactérie est en partie régulée par un mécanisme de Quorum Sensing (QS), associé à la densité cellulaire (Pearson *et al.*, 2000 ; Venturi, 2006).

Les travaux de l'équipe TheREx ont permis de développer une souche atténuée de la bactérie, auxotrophe pour le tryptophane et présentant une virulence moindre via une modification de son mécanisme de QS. Chez *P. aeruginosa*, le métabolisme du tryptophane est étroitement lié au mécanisme du QS ; en particulier, le tryptophane est un précurseur de l'anthranilate, une des molécules activatrices du QS (Knoten *et al.*, 2011). Grâce à la méthode cre-lox/SacB déjà évoquée (Quénée *et al.*, 2005), l'équipe TheREx a développé, à partir de la souche OST, la souche CHA-OAL (Δ exoS, Δ exoT, Δ aroA, Δ lasI). AroA (3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransférase) est une enzyme impliquée dans la synthèse du tryptophane chez *P. aeruginosa* ; LasI est un des régulateurs majeurs des gènes impliqués dans le mécanisme du QS. Via la délétion de ces deux gènes, la souche générée présente une toxicité très faible tout en conservant un SST3 très actif. Dans les essais d'utilisation de la bactérie comme vecteur d'immunothérapie active et spécifique, une réponse immunitaire spécifique supérieure de la souche OAL par rapport à la souche OST a été obtenue lors d'essais chez la souris sur le modèle B16-Ova. De plus, l'auxotrophie pour le tryptophane confère aux bactéries une vitesse de croissance très réduite en milieu sans tryptophane et permet ainsi de mieux contrôler la dissémination (Epaulard *et al.*, 2008) dans d'éventuels protocoles de vaccination.

L'utilisation de cette souche OAL est envisagée et pourrait permettre de se rapprocher du compromis activité/toxicité qui nous permettra d'induire efficacement la reprogrammation de nos deux types cellulaires d'intérêt. De plus, une souche CLIN1 capable de pousser en milieu chimiquement défini, a été générée à partir de la souche OAL (Wang *et al.*, 2012a ; brevet WO 2013/087667). Déclassée en catégorie I, elle facilite d'avantage les conditions d'utilisation du vecteur et renforce sa sécurité.

2. Perspectives d'applications

i. Mise en application à la génération sécurisée d'iPS

Comme nous venons de le voir, il paraît difficile d'envisager d'utiliser la souche OST en l'état pour générer des cellules destinées à des applications cliniques. L'utilisation de souches atténuées, présentant une capacité de prolifération ou de dissémination réduite, semble une meilleure alternative.

En effet, bien qu'il soit possible d'éliminer efficacement la bactérie des cultures, nous savons que *P. aeruginosa* est une bactérie adaptative capable de développer rapidement des résistances aux antibiotiques. L'utilisation d'une souche incapable de se répliquer serait l'idéal. La souche OST- Δ uvrAB est prometteuse, bien que le protocole photochimique atténuateur associé ne permette pour le moment pas d'initier le processus de reprogrammation. La souche OAL pourrait être une alternative très intéressante.

D'autre part, des travaux, récents ont montré que la bactérie était responsable de dommages génotoxiques et notamment de cassures double-brins de l'ADN (Elsen *et al.*, 2013). Bien que la protéine majoritairement responsable de ces lésions, à savoir ExoS, ait été délétée dans la souche OST utilisée, la délétion d'autres exotoxines telles qu'ExoA ou ExoY, permettrait peut-être de réduire un peu plus cette génotoxicité.

En revanche, le SST3 est un système de reprogrammation facilement compatible avec une mise à l'échelle, simplement en augmentant le volume de production, étant donné qu'il ne requière aucune étape de purification. De plus la possibilité de congeler la bactérie "prête à injecter" offre la possibilité de créer des lots, permettant de standardiser le protocole de reprogrammation. Ce procédé de congélation est bien évidemment une preuve de concept à l'heure actuelle, et de nombreux paramètres pourront être modifiés, comme la composition

du milieu de congélation ou encore la cinétique de transition de température, afin de conserver un SST3 le plus actif possible.

ii. Transdifférenciation

En plus de la reprogrammation de cellules somatiques en cellules pluripotentes, il est possible de convertir directement un type cellulaire en un autre, sans passer par le stade cellule souche. On parle de transdifférenciation cellulaire. De la même manière que pour la génération d'iPS, la transdifférenciation consiste à surexprimer certains facteurs de transcription normalement fortement exprimés dans certains tissus.

Il est aujourd'hui possible de convertir des fibroblastes en de nombreux types cellulaires, tels que des ostéoblastes (Yamamoto *et al.*, 2015), des astrocytes (Caiazzo *et al.*, 2015), des mélanocytes (Yang *et al.*, 2014), ou encore des progéniteurs hématopoïétiques CD45⁺ avec Oct4 seulement (Szabo *et al.*, 2010). Les CSH de sang de cordon peuvent également être converties en d'autres types cellulaires (Liao *et al.*, 2015).

Bien que la plupart des protocoles de transdifférenciation soient aussi basés sur l'utilisation de systèmes intégratifs, des travaux récents ont montré qu'il était possible de générer des neurones à l'aide d'un miARN (Victor *et al.*, 2014) mais aussi du CPP Tat (Mirakhori *et al.*, 2015). De plus comme évoqué dans l'introduction, en 2013, l'équipe de Jin a réussi à convertir des fibroblastes murins en myocytes, grâce au SST3 de *P. aeruginosa*, en vectorisant MyoD uniquement (Bichsel *et al.*, 2013).

Ces données prêtent ainsi une toute nouvelle application aux vecteurs de protéines, avec tous les avantages qui les caractérisent en comparaison des vecteurs intégratifs. En ce qui concerne le SST3, la possibilité de différencier des cellules à l'aide d'un seul facteur permettrait certainement de réduire la toxicité observée avec notre combinaison de facteurs de transcription embryonnaires. Ainsi, en plus de l'immunothérapie et de la production de protéines recombinantes, le SST3 de *P. aeruginosa* apparaît comme un système prometteur pour la génération d'iPS mais aussi pour la transdifférenciation cellulaire.

L'objectif de ce projet est de développer un nouveau système innovant de reprogrammation de cellules somatiques en iPS par transfert de protéines, à la fois efficace et sécurisé. Bien que nous n'ayons pas encore généré d'iPS à ce jour, nous avons démontré que le SST3 de *P. aeruginosa* était un vecteur tout à fait pertinent dans l'optique de produire des iPS de manière sécurisée. Le vecteur est capable d'injecter les facteurs de transcription embryonnaires de Thomson (OSNL) et c-Myc, directement dans le cytoplasme des cellules à reprogrammer, induisant une activation rapide de l'expression des gènes cibles. Nous sommes néanmoins confrontés à des problèmes de toxicité et d'efficacité de translocation, sur les fibroblastes et les CSH de sang de cordon, respectivement. L'utilisation de souches atténuées de la bactérie ainsi que l'apport de Klf4 à l'aide de MD11 ou du Dd font partie des pistes d'optimisation à exploiter. De la même manière, l'exploration d'éventuelles modifications épigénétiques induites par la bactérie permettrait sans doute d'améliorer notre compréhension du processus de reprogrammation par ce vecteur ainsi que d'améliorer l'efficacité associée. Pour conclure, il est important de noter que très peu de travaux à ce jour ont mis en avant la génération d'iPS par transfert de protéines. Ceci est certainement lié à une concentration intracellulaire plus faible des facteurs exogènes ainsi qu'à une dégradation relativement rapide des protéines internalisées, en comparaison des systèmes de reprogrammation par transfert d'acides nucléiques. Le challenge étant déjà considérable avec des vecteurs plus conventionnels tels que des CPP, il l'est encore d'avantage avec un vecteur aussi complexe que le SST3.

Références bibliographiques

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., *et al.* (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* 26, 1276–1284.
- Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Cañamero, M., Rayon, T., Ors, I., Graña, O., Megías, D., Domínguez, O., Martínez, D., *et al.* (2013). Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature* 502, 340–345.
- Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P.W., Beighton, G., Bello, P.A., Benvenisty, N., Berry, L.S., Bevan, S., *et al.* (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat. Biotechnol.* 25, 803–816.
- Adhikary, S., and Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 635–645.
- Aggarwal, R., Lu, J., Pompili, V.J., and Das, H. (2012). Hematopoietic stem cells: transcriptional regulation, ex vivo expansion and clinical application. *Curr. Mol. Med.* 12, 34–49.
- Aksoy, I., Giudice, V., Delahaye, E., Wianny, F., Aubry, M., Mure, M., Chen, J., Jauch, R., Bogu, G.K., Nolden, T., *et al.* (2014). Klf4 and Klf5 differentially inhibit mesoderm and endoderm differentiation in embryonic stem cells. *Nat. Commun.* 5.
- Amati, B., Dalton, S., Brooks, M.W., Littlewood, T.D., Evan, G.I., and Land, H. (1992). Transcriptional activation by the human c-Myc oncoprotein in yeast requires interaction with Max. *Nature* 359, 423–426.
- Ambrosetti, D.C., Basilico, C., and Dailey, L. (1997). Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6321–6329.
- Ambrosetti, D.C., Schöler, H.R., Dailey, L., and Basilico, C. (2000). Modulation of the activity of multiple transcriptional activation domains by the DNA binding domains mediates the synergistic action of Sox2 and Oct-3 on the fibroblast growth factor-4 enhancer. *J. Biol. Chem.* 275, 23387–23397.
- Amon, W., and Farrell, P.J. (2005). Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *Rev. Med. Virol.* 15, 149–156.
- Ang, Y.-S., Tsai, S.-Y., Lee, D.-F., Monk, J., Su, J., Ratnakumar, K., Ding, J., Ge, Y., Darr, H., Chang, B., *et al.* (2011). Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network. *Cell* 145, 183–197.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C.M., Jühr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P.J., Epstein, J.A., *et al.* (2011). Highly Efficient miRNA-Mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency. *Cell Stem Cell* 8, 376–388.
- Araki, R., Uda, M., Hoki, Y., Sunayama, M., Nakamura, M., Ando, S., Sugiura, M., Ideno, H., Shimada, A., Nifuji, A., *et al.* (2013). Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature* 494, 100–104.
- Awe, J.P., Lee, P.C., Ramathal, C., Vega-Crespo, A., Durruthy-Durruthy, J., Cooper, A., Karumbayaram, S., Lowry, W.E., Clark, A.T., Zack, J.A., *et al.* (2013). Generation and characterization of transgene-free human induced pluripotent stem cells and conversion to putative clinical-grade status. *Stem Cell Res. Ther.* 4, 87.

- Awong, G. (2011). Thymus-bound: the many features of T cell progenitors. *Front. Biosci.* *53*, 961.
- Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jørgensen, H.F., John, R.M., Gouti, M., Casanova, M., Warnes, G., Merckenschlager, M., *et al.* (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat. Cell Biol.* *8*, 532–538.
- Bai, Q., Ramirez, J.-M., Becker, F., Pantesco, V., Lavabre-Bertrand, T., Hovatta, O., Lemaître, J.-M., Pellestor, F., and De Vos, J. (2015). Temporal Analysis of Genome Alterations Induced by Single-Cell Passaging in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev.* *24*, 653–662.
- Balvay, L., Soto Rifo, R., Ricci, E.P., Decimo, D., and Ohlmann, T. (2009). Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim. Biophys. Acta* *1789*, 542–557.
- Ban, H., Nishishita, N., Fusaki, N., Tabata, T., Saeki, K., Shikamura, M., Takada, N., Inoue, M., Hasegawa, M., Kawamata, S., *et al.* (2011). Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 14234–14239.
- Baudino, T.A. (2002). c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev.* *16*, 2530–2543.
- Bayart, E., and Cohen-Haguenauer, O. (2013). Technological overview of iPS induction from human adult somatic cells. *Curr. Gene Ther.* *13*, 73–92.
- Beattie, B.K., Prentice, G.A., and Merrill, A.R. (1996). Investigation into the catalytic role for the tryptophan residues within domain III of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Biochemistry (Mosc.)* *35*, 15134–15142.
- Beckert, U., Wolter, S., Hartwig, C., Bähre, H., Kaever, V., Ladant, D., Frank, D.W., and Seifert, R. (2014). ExoY from *Pseudomonas aeruginosa* is a nucleotidyl cyclase with preference for cGMP and cUMP formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *450*, 870–874.
- Bellin, M., Marchetto, M.C., Gage, F.H., and Mummery, C.L. (2012). Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 713–726.
- Bergsbaken, T., Fink, S.L., and Cookson, B.T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* *7*, 99–109.
- Berk, R.S., Brown, D., Coutinho, I., and Meyers, D. (1987). In vivo studies with two phospholipase C fractions from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* *55*, 1728–1730.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., *et al.* (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* *125*, 315–326.
- Bhutani, N., Brady, J.J., Damian, M., Sacco, A., Corbel, S.Y., and Blau, H.M. (2010). Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* *463*, 1042–1047.
- Bichsel, C., Neeld, D.K., Hamazaki, T., Wu, D., Chang, L.-J., Yang, L., Terada, N., and Jin, S. (2011). Bacterial Delivery of Nuclear Proteins into Pluripotent and Differentiated Cells. *PLoS ONE* *6*, e16465.
- Bichsel, C., Neeld, D., Hamazaki, T., Chang, L.-J., Yang, L.-J., Terada, N., and Jin, S. (2013). Direct reprogramming of fibroblasts to myocytes via bacterial injection of MyoD protein. *Cell. Reprogramming* *15*, 117–125.
- Blackwood, E.M., and Eisenman, R.N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* *251*, 1211–1217.
- Blackwood, E.M., Lüscher, B., and Eisenman, R.N. (1992). Myc and Max associate in vivo. *Genes Dev.* *6*, 71–80.

- Blanc, D.S., Petignat, C., Janin, B., Bille, J., and Francioli, P. (1998). Frequency and molecular diversity of *Pseudomonas aeruginosa* upon admission and during hospitalization: a prospective epidemiologic study. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 4, 242–247.
- Bland, R.D., Clarke, T.L., and Harden, L.B. (1976). Rapid infusion of sodium bicarbonate and albumin into high-risk premature infants soon after birth: a controlled, prospective trial. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 124, 263–267.
- Blau, H.M., Chiu, C.P., and Webster, C. (1983). Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* 32, 1171–1180.
- Blevès, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G.P.F., Filloux, A., and Voulhoux, R. (2010). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 534–543.
- Blum, B., and Benvenisty, N. (2008). The Tumorigenicity of Human Embryonic Stem Cells. In *Advances in Cancer Research*, (Elsevier), pp. 133–158.
- Boldrin, L., Muntoni, F., and Morgan, J.E. (2010). Are Human and Mouse Satellite Cells Really the Same? *J. Histochem. Cytochem.* 58, 941–955.
- Botquin, V., Hess, H., Fuhrmann, G., Anastassiadis, C., Gross, M.K., Vriend, G., and Schöler, H.R. (1998). New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev.* 12, 2073–2090.
- Bouchard, C. (2001). Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev.* 15, 2042–2047.
- Bouchard, C., Marquardt, J., Brás, A., Medema, R.H., and Eilers, M. (2004). Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *EMBO J.* 23, 2830–2840.
- Boulting, G.L., Kiskinis, E., Croft, G.F., Amoroso, M.W., Oakley, D.H., Wainger, B.J., Williams, D.J., Kahler, D.J., Yamaki, M., Davidow, L., *et al.* (2011). A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 29, 279–286.
- Bowles, J., Schepers, G., and Koopman, P. (2000). Phylogeny of the SOX Family of Developmental Transcription Factors Based on Sequence and Structural Indicators. *Dev. Biol.* 227, 239–255.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., *et al.* (2005). Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 122, 947–956.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., and Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309, 255–256.
- Brault, J., Goutagny, E., Telugu, N., Shao, K., Baquié, M., Satre, V., Coutton, C., Grunwald, D., Brion, J.-P., Barlogis, V., *et al.* (2014). Optimized Generation of Functional Neutrophils and Macrophages from Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells: Ex Vivo Models of X(0)-Linked, AR22(0)- and AR47(0)- Chronic Granulomatous Diseases. *BioResearch Open Access* 3, 311–326.
- Briggs, R., and King, T.J. (1952). Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 38, 455–463.
- Brockstedt, D.G., Bahjat, K.S., Giedlin, M.A., Liu, W., Leong, M., Lockett, W., Gao, Y., Schnupf, P., Kapadia, D., Castro, G., *et al.* (2005). Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity. *Nat. Med.* 11, 853–860.

- Broxmeyer, H.E., Gluckman, E., Auerbach, A., Douglas, G.W., Friedman, H., Cooper, S., Hangoc, G., Kurtzberg, J., Bard, J., and Boyse, E.A. (1990). Human umbilical cord blood: a clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Int. J. Cell Cloning* 8 *Suppl 1*, 76–89 ; discussion 89–91.
- Bruno, T.F., Woods, D.E., and Mody, C.H. (2000). Exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa* induces apoptosis in T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 67, 808–816.
- Bucior, I., Mostov, K., and Engel, J.N. (2010). *Pseudomonas aeruginosa*-Mediated Damage Requires Distinct Receptors at the Apical and Basolateral Surfaces of the Polarized Epithelium. *Infect. Immun.* 78, 939–953.
- Buganim, Y., Faddah, D.A., and Jaenisch, R. (2013). Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat. Rev. Genet.* 14, 427–439.
- Burgess, R.R. (2009). Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods Enzymol.* 463, 259–282.
- Burrows, L.L. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 493–520.
- Buzzard, J.J., Gough, N.M., Crook, J.M., and Colman, A. (2004). Karyotype of human ES cells during extended culture. *Nat. Biotechnol.* 22, 381–382 ; author reply 382.
- Caiazzo, M., Giannelli, S., Valente, P., Lignani, G., Carissimo, A., Sessa, A., Colasante, G., Bartolomeo, R., Massimino, L., Ferroni, S., *et al.* (2015). Direct Conversion of Fibroblasts into Functional Astrocytes by Defined Transcription Factors. *Stem Cell Rep.* 4, 25–36.
- Card, D.A.G., Hebbbar, P.B., Li, L., Trotter, K.W., Komatsu, Y., Mishina, Y., and Archer, T.K. (2008). Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 28, 6426–6438.
- Carotta, S., and Nutt, S.L. (2008). Losing B cell identity. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 30, 203–207.
- Carson, J.L., Grossman, B.J., Kleinman, S., Tinmouth, A.T., Marques, M.B., Fung, M.K., Holcomb, J.B., Illoh, O., Kaplan, L.J., Katz, L.M., *et al.*, Clinical Transfusion Medicine Committee of the AABB (2012). Red blood cell transfusion: a clinical practice guideline from the AABB*. *Ann. Intern. Med.* 157, 49–58.
- Cartwright, P. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 132, 885–896.
- Cauffman, G., Liebaers, I., Van Steirteghem, A., and Van de Velde, H. (2006). POU5F1 Isoforms Show Different Expression Patterns in Human Embryonic Stem Cells and Preimplantation Embryos. *Stem Cells* 24, 2685–2691.
- Ceballos-Olvera, I., Sahoo, M., Miller, M.A., Barrio, L. del, and Re, F. (2011). Inflammasome-dependent Pyroptosis and IL-18 Protect against *Burkholderia pseudomallei* Lung Infection while IL-1 β Is Deleterious. *PLoS Pathog.* 7, e1002452.
- Chambers, I., and Tomlinson, S.R. (2009). The transcriptional foundation of pluripotency. *Development* 136, 2311–2322.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643–655.
- Chang, H.-M., Martinez, N.J., Thornton, J.E., Hagan, J.P., Nguyen, K.D., and Gregory, R.I. (2012). Trim71 cooperates with microRNAs to repress Cdkn1a expression and promote embryonic stem cell proliferation. *Nat. Commun.* 3, 923.

- Chemani, C., Imberty, A., de Bentzmann, S., Pierre, M., Wimmerová, M., Guery, B.P., and Faure, K. (2009). Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect. Immun.* *77*, 2065–2075.
- Chen, K.G., Mallon, B.S., McKay, R.D.G., and Robey, P.G. (2014). Human Pluripotent Stem Cell Culture: Considerations for Maintenance, Expansion, and Therapeutics. *Cell Stem Cell* *14*, 13–26.
- Chen, Z.-Y., He, C.-Y., Ehrhardt, A., and Kay, M.A. (2003). Minicircle DNA vectors devoid of bacterial DNA result in persistent and high-level transgene expression in vivo. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *8*, 495–500.
- Chen, Z.-Y., He, C.-Y., and Kay, M.A. (2005). Improved production and purification of minicircle DNA vector free of plasmid bacterial sequences and capable of persistent transgene expression in vivo. *Hum. Gene Ther.* *16*, 126–131.
- Cho, H.-J., Lee, C.-S., Kwon, Y.-W., Paek, J.S., Lee, S.-H., Hur, J., Lee, E.J., Roh, T.-Y., Chu, I.-S., Leem, S.-H., *et al.* (2010). Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood* *116*, 386–395.
- Cho, S.J., Choi, H.W., Cho, J., Jung, S., Seo, H.G., and Do, J.T. (2013). Activation of pluripotency genes by a nanotube-mediated protein delivery system. *Mol. Reprod. Dev.* *80*, 1000–1008.
- Choi, H.W., Kim, J.S., Choi, S., Hong, Y.J., Kim, M.J., Seo, H.G., and Do, J.T. (2014). Neural stem cells differentiated from iPS cells spontaneously regain pluripotency. *Stem Cells Dayt. Ohio* *32*, 2596–2604.
- Chung, Y.G., Eum, J.H., Lee, J.E., Shim, S.H., Sepilian, V., Hong, S.W., Lee, Y., Treff, N.R., Choi, Y.H., Kimbrel, E.A., *et al.* (2014). Human Somatic Cell Nuclear Transfer Using Adult Cells. *Cell Stem Cell* *14*, 777–780.
- Claassen, G.F., and Hann, S.R. (1999). Myc-mediated transformation: the repression connection. *Oncogene* *18*, 2925–2933.
- Cohen, C.J., Shieh, J.T., Pickles, R.J., Okegawa, T., Hsieh, J.T., and Bergelson, J.M. (2001). The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 15191–15196.
- Cole, M.D., and Cowling, V.H. (2008). Transcription-independent functions of MYC: regulation of translation and DNA replication. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 810–815.
- Coller, H.A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E.S., Eisenman, R.N., and Golub, T.R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *97*, 3260–3265.
- Conner, S.D., and Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* *422*, 37–44.
- Cornelis, G.R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nat. Rev. Microbiol.* *4*, 811–825.
- Covello, K.L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J.D., Arsham, A.M., Hu, C.-J., Labosky, P.A., Simon, M.C., and Keith, B. (2006). HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* *20*, 557–570.
- Cowan, C.A., Atienza, J., Melton, D.A., and Eggan, K. (2005). Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* *309*, 1369–1373.
- Cowell, B.A., Evans, D.J., and Fleiszig, S.M.J. (2005). Actin cytoskeleton disruption by ExoY and its effects on *Pseudomonas aeruginosa* invasion. *FEMS Microbiol. Lett.* *250*, 71–76.

- Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C., and Toussaint, B. (1999). Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infect. Immun.* 67, 6164–6167.
- Dacheux, D., Goure, J., Chabert, J., Usson, Y., and Attree, I. (2001). Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol. Microbiol.* 40, 76–85.
- Damjanov, I. (2005). The road from teratocarcinoma to human embryonic stem cells. *Stem Cell Rev.* 1, 273–276.
- Darst, R.P., Pardo, C.E., Ai, L., Brown, K.D., and Kladde, M.P. (2010). Bisulfite sequencing of DNA. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Ed. Frederick M Ausubel *Chapter 7*, Unit 7.9.1–17.
- Dasgupta, N., Lykken, G.L., Wolfgang, M.C., and Yahr, T.L. (2004). A novel anti-anti-activator mechanism regulates expression of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol. Microbiol.* 53, 297–308.
- David, L., and Polo, J.M. (2014). Phases of reprogramming. *Stem Cell Res.* 12, 754–761.
- Davidson, R.L., Ephrussi, B., and Yamamoto, K. (1966). Regulation of pigment synthesis in mammalian cells, as studied by somatic hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 56, 1437–1440.
- Davis, R.L., Weintraub, H., and Lassar, A.B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 51, 987–1000.
- Van Delden, C., and Iglewski, B.H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 4, 551–560.
- Demain, A.L., and Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol. Adv.* 27, 297–306.
- Deng, Q., and Barbieri, J.T. (2008). Molecular Mechanisms of the Cytotoxicity of ADP-Ribosylating Toxins. *Annu. Rev. Microbiol.* 62, 271–288.
- Deng, Q., Zhang, Y., and Barbieri, J.T. (2007). Intracellular Trafficking of *Pseudomonas* ExoS, a Type III Cytotoxin. *Traffic* 8, 1331–1345.
- Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 10444–10450.
- Derouazi, M., Toussaint, B., Quenee, L., Epaulard, O., Guillaume, M., Marlu, R., and Polack, B. (2008). High-Yield Production of Secreted Active Proteins by the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3601–3604.
- Derouazi, M., Wang, Y., Marlu, R., Epaulard, O., Mayol, J.-F., Pasqual, N., Le Gouellec, A., Polack, B., and Toussaint, B. (2010). Optimal epitope composition after antigen screening using a live bacterial delivery vector: application to TRP-2. *Bioeng. Bugs* 1, 51–60.
- Drews, K., Jozefczuk, J., Prigione, A., and Adjaye, J. (2012). Human induced pluripotent stem cells—from mechanisms to clinical applications. *J. Mol. Med.* 90, 735–745.
- Elliott, G., and O’Hare, P. (1997). Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88, 223–233.
- Elmqvist, A., Lindgren, M., Bartfai, T., and Langel U, null (2001). VE-cadherin-derived cell-penetrating peptide, pVEC, with carrier functions. *Exp. Cell Res.* 269, 237–244.

- Elsen, S., Collin-Faure, V., Gidrol, X., and Lemerrier, C. (2013). The opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* activates the DNA double-strand break signaling and repair pathway in infected cells. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 70, 4385–4397.
- Eminli, S., Foudi, A., Stadtfeld, M., Maherali, N., Ahfeldt, T., Mostoslavsky, G., Hock, H., and Hochedlinger, K. (2009). Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat. Genet.* 41, 968–976.
- Epaulard, O., Toussaint, B., Quenee, L., Derouazi, M., Bosco, N., Villiers, C., Le Berre, R., Guery, B., Filopon, D., Crombez, L., *et al.* (2006a). Anti-tumor immunotherapy via antigen delivery from a live attenuated genetically engineered *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system-based vector. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 14, 656–661.
- Epaulard, O., Toussaint, B., Quenee, L., Derouazi, M., Bosco, N., Villiers, C., Leberre, R., Guery, B., Filopon, D., and Crombez, L. (2006b). Anti-tumor Immunotherapy via Antigen Delivery from a Live Attenuated Genetically Engineered *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System-Based Vector. *Mol. Ther.* 14, 656–661.
- Esteban, M.A., Wang, T., Qin, B., Yang, J., Qin, D., Cai, J., Li, W., Weng, Z., Chen, J., Ni, S., *et al.* (2010). Vitamin C Enhances the Generation of Mouse and Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 6, 71–79.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.
- Facchini, L.M., and Penn, L.Z. (1998). The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 12, 633–651.
- Faudry, E., Vernier, G., Neumann, E., Forge, V., and Attree, I. (2006). Synergistic pore formation by type III toxin translocators of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 8117–8123.
- Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L., Brunnert, S., Tang, H., and Prince, A. (1998). Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect. Immun.* 66, 43–51.
- Felsher, D.W., and Bishop, J.M. (1999). Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 3940–3944.
- Feltman, H., Schulert, G., Khan, S., Jain, M., Peterson, L., and Hauser, A.R. (2001). Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Read. Engl.* 147, 2659–2669.
- Fender, P., Ruigrok, R.W.H., Gout, E., Buffet, S., and Chroboczek, J. (1997). Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer. *Nat. Biotechnol.* 15, 52–56.
- Fender, P., Schoehn, G., Foucaud-Gamen, J., Gout, E., Garcel, A., Drouet, E., and Chroboczek, J. (2003). Adenovirus Dodecahedron Allows Large Multimeric Protein Transduction in Human Cells. *J. Virol.* 77, 4960–4964.
- Fender, P., Boussaid, A., Mezin, P., and Chroboczek, J. (2005). Synthesis, cellular localization, and quantification of penton-dodecahedron in serotype 3 adenovirus-infected cells. *Virology* 340, 167–173.
- Fernandez, P.C., Frank, S.R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A., and Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev.* 17, 1115–1129.
- Finck-Barbançon, V., Yahr, T.L., and Frank, D.W. (1998). Identification and characterization of SpcU, a chaperone required for efficient secretion of the ExoU cytotoxin. *J. Bacteriol.* 180, 6224–6231.

- Fischer, R., Kohler, K., Fotin-Mleczek, M., and Brock, R. (2004). A Stepwise Dissection of the Intracellular Fate of Cationic Cell-penetrating Peptides. *J. Biol. Chem.* 279, 12625–12635.
- Foster, K.W., Ren, S., Louro, I.D., Lobo-Ruppert, S.M., McKie-Bell, P., Grizzle, W., Hayes, M.R., Broker, T.R., Chow, L.T., and Ruppert, J.M. (1999). Oncogene expression cloning by retroviral transduction of adenovirus E1A-immortalized rat kidney RK3E cells: transformation of a host with epithelial features by c-MYC and the zinc finger protein GKLf. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 423–434.
- Foster, K.W., Frost, A.R., McKie-Bell, P., Lin, C.Y., Engler, J.A., Grizzle, W.E., and Ruppert, J.M. (2000). Increase of GKLf messenger RNA and protein expression during progression of breast cancer. *Cancer Res.* 60, 6488–6495.
- Frank, D.W. (1997). The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 26, 621–629.
- Frank, S.R., Schroeder, M., Fernandez, P., Taubert, S., and Amati, B. (2001). Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes Dev.* 15, 2069–2082.
- Frankel, A.D., and Pabo, C.O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55, 1189–1193.
- Frithz-Lindsten, E., Du, Y., Rosqvist, R., and Forsberg, A. (1997). Intracellular targeting of exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* via type III-dependent translocation induces phagocytosis resistance, cytotoxicity and disruption of actin microfilaments. *Mol. Microbiol.* 25, 1125–1139.
- Frum, T., Halbisen, M.A., Wang, C., Amiri, H., Robson, P., and Ralston, A. (2013). Oct4 cell-autonomously promotes primitive endoderm development in the mouse blastocyst. *Dev. Cell* 25, 610–622.
- Fujikura, J. (2002). Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev.* 16, 784–789.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 85, 348–362.
- Fuschiotti, P., Schoehn, G., Fender, P., Fabry, C.M.S., Hewat, E.A., Chroboczek, J., Ruigrok, R.W.H., and Conway, J.F. (2006). Structure of the Dodecahedral Penton Particle from Human Adenovirus Type 3. *J. Mol. Biol.* 356, 510–520.
- Galinier, R., Gout, E., Lortat-Jacob, H., Wood, J., and Chroboczek, J. (2002). Adenovirus protein involved in virus internalization recruits ubiquitin-protein ligases. *Biochemistry (Mosc.)* 41, 14299–14305.
- Galle, M., Jin, S., Bogaert, P., Haegman, M., Vandenabeele, P., and Beyaert, R. (2012). The *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System Has an Exotoxin S/T/Y Independent Pathogenic Role during Acute Lung Infection. *PLoS ONE* 7, e41547.
- Galloway, D.R. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. *Mol. Microbiol.* 5, 2315–2321.
- Garcel, A., Gout, E., Timmins, J., Chroboczek, J., and Fender, P. (2006). Protein transduction into human cells by adenovirus dodecahedron using WW domains as universal adaptors. *J. Gene Med.* 8, 524–531.
- Georgiou, G., Valax, P., Ostermeier, M., and Horowitz, P.M. (1994). Folding and aggregation of TEM beta-lactamase: analogies with the formation of inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 3, 1953–1960.

- Giarratana, M.-C., Rouard, H., Dumont, A., Kiger, L., Safeukui, I., Le Pennec, P.-Y., François, S., Trugnan, G., Peyrard, T., Marie, T., *et al.* (2011). Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells. *Blood* 118, 5071–5079.
- Gifford, C.A., and Meissner, A. (2012). Epigenetic obstacles encountered by transcription factors: reprogramming against all odds. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22, 409–415.
- Golipour, A., David, L., Liu, Y., Jayakumaran, G., Hirsch, C.L., Trcka, D., and Wrana, J.L. (2012). A Late Transition in Somatic Cell Reprogramming Requires Regulators Distinct from the Pluripotency Network. *Cell Stem Cell* 11, 769–782.
- Gonzalez, F., Barragan Monasterio, M., Tiscornia, G., Montserrat Pulido, N., Vassena, R., Batlle Morera, L., Rodriguez Piza, I., and Belmonte, J.C.I. (2009). Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 8918–8922.
- González, F., Boué, S., and Belmonte, J.C.I. (2011). Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *Nat. Rev. Genet.* 12, 231–242.
- Gore, A., Li, Z., Fung, H.-L., Young, J.E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M.A., Kiskinis, E., *et al.* (2011). Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 63–67.
- Le Gouëllec, A., Chauchet, X., Laurin, D., Aspor, C., Verove, J., Wang, Y., Genestet, C., Trocme, C., Ahmadi, M., Martin, S., *et al.* (2013). A safe bacterial microsyringe for in vivo antigen delivery and immunotherapy. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 21, 1076–1086.
- Goure, J., Pastor, A., Faudry, E., Chabert, J., Dessen, A., and Attree, I. (2004). The V Antigen of *Pseudomonas aeruginosa* Is Required for Assembly of the Functional PopB/PopD Translocation Pore in Host Cell Membranes. *Infect. Immun.* 72, 4741–4750.
- Greber, U.F., Willetts, M., Webster, P., and Helenius, A. (1993). Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75, 477–486.
- Green, M., and Loewenstein, P.M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* 55, 1179–1188.
- Green, M., Ishino, M., and Loewenstein, P.M. (1989). Mutational analysis of HIV-1 Tat minimal domain peptides: identification of trans-dominant mutants that suppress HIV-LTR-driven gene expression. *Cell* 58, 215–223.
- Green, S.K., Schroth, M.N., Cho, J.J., Kominos, S.K., and Vitanza-jack, V.B. (1974). Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol.* 28, 987–991.
- Guenther, M.G., Frampton, G.M., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2010). Chromatin Structure and Gene Expression Programs of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 7, 249–257.
- Guha, P., Morgan, J.W., Mostoslavsky, G., Rodrigues, N.P., and Boyd, A.S. (2013). Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 12, 407–412.
- Gurdon, J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 10, 622–640.
- Gutierrez-Aranda, I., Ramos-Mejia, V., Bueno, C., Munoz-Lopez, M., Real, P.J., Mácia, A., Sanchez, L., Liger, G., Garcia-Perez, J.L., and Menendez, P. (2010). Human Induced Pluripotent Stem Cells Develop Teratoma More Efficiently and Faster Than Human Embryonic Stem Cells Regardless the Site of Injection. *STEM CELLS* 28, 1568–1570.

- Hagan, J.P., Piskounova, E., and Gregory, R.I. (2009). Lin28 recruits the TUTase Zcchc11 to inhibit let-7 maturation in mouse embryonic stem cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1021–1025.
- Hahn, H.P. (1997). The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa*—a review. *Gene* 192, 99–108.
- Hancock, R.E.W., and Speert, D.P. (2000). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 3, 247–255.
- Hansson, J., Rafiee, M.R., Reiland, S., Polo, J.M., Gehring, J., Okawa, S., Huber, W., Hochedlinger, K., and Krijgsveld, J. (2012). Highly Coordinated Proteome Dynamics during Reprogramming of Somatic Cells to Pluripotency. *Cell Rep.* 2, 1579–1592.
- Hatano, S., Tada, M., Kimura, H., Yamaguchi, S., Kono, T., Nakano, T., Suemori, H., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2005). Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mech. Dev.* 122, 67–79.
- Hauser, A.R. (2009). The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 654–665.
- Hay, D.C., Sutherland, L., Clark, J., and Burdon, T. (2004). Oct-4 Knockdown Induces Similar Patterns of Endoderm and Trophoblast Differentiation Markers in Human and Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 22, 225–235.
- Heitz, F., Morris, M.C., and Divita, G. (2009). Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br. J. Pharmacol.* 157, 195–206.
- Heo, I., Joo, C., Cho, J., Ha, M., Han, J., and Kim, V.N. (2008). Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol. Cell* 32, 276–284.
- Heo, I., Ha, M., Lim, J., Yoon, M.-J., Park, J.-E., Kwon, S.C., Chang, H., and Kim, V.N. (2012). Mono-uridylation of pre-microRNA as a key step in the biogenesis of group II let-7 microRNAs. *Cell* 151, 521–532.
- Herr, W., and Cleary, M.A. (1995). The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. *Genes Dev.* 9, 1679–1693.
- Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., *et al.* (2013). Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science* 341, 651–654.
- Hough, S.R., Clements, I., Welch, P.J., and Wiederholt, K.A. (2006). Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells after RNA Interference-Mediated Silencing of OCT4 and Nanog. *STEM CELLS* 24, 1467–1475.
- Howell, C.Y., Bestor, T.H., Ding, F., Latham, K.E., Mertineit, C., Trasler, J.M., and Chaillet, J.R. (2001). Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 104, 829–838.
- Hu, K. (2014). All Roads Lead to Induced Pluripotent Stem Cells: The Technologies of iPSC Generation. *Stem Cells Dev.* 23, 1285–1300.
- Hu, Q., and Rosenfeld, M.G. (2012). Epigenetic regulation of human embryonic stem cells. *Front. Genet.* 3.
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. (2008a). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* 26, 1269–1275.

- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., and Melton, D.A. (2008b). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* 26, 795–797.
- Humme, S., Reisbach, G., Feederle, R., Delecluse, H.-J., Bousset, K., Hammerschmidt, W., and Schepers, A. (2003). The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10989–10994.
- Hussein, S.M., Batada, N.N., Vuoristo, S., Ching, R.W., Autio, R., Närvä, E., Ng, S., Sourour, M., Hämäläinen, R., Olsson, C., *et al.* (2011). Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 471, 58–62.
- Ichida, J.K., Blanchard, J., Lam, K., Son, E.Y., Chung, J.E., Egli, D., Loh, K.M., Carter, A.C., Di Giorgio, F.P., Koszka, K., *et al.* (2009). A Small-Molecule Inhibitor of Tgf- β Signaling Replaces Sox2 in Reprogramming by Inducing Nanog. *Cell Stem Cell* 5, 491–503.
- Ivanova, N., Dobrin, R., Lu, R., Kotenko, I., Levorse, J., DeCoste, C., Schafer, X., Lun, Y., and Lemischka, I.R. (2006). Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 442, 533–538.
- Ivanovic, Z., and Boiron, J.-M. (2009). Expansion ex vivo des cellules hematopoïétiques : concept et utilité clinique. *Transfus. Clin. Biol.* 16, 489–500.
- Ivics, Z., Li, M.A., Mátés, L., Boeke, J.D., Nagy, A., Bradley, A., and Izsvák, Z. (2009). Transposon-mediated genome manipulation in vertebrates. *Nat. Methods* 6, 415–422.
- Izsvak, Z. (2004). Sleeping Beauty Transposition: Biology and Applications for Molecular Therapy. *Mol. Ther.* 9, 147–156.
- Jauch, R., Ng, C.K.L., Saikatendu, K.S., Stevens, R.C., and Kolatkar, P.R. (2008). Crystal Structure and DNA Binding of the Homeodomain of the Stem Cell Transcription Factor Nanog. *J. Mol. Biol.* 376, 758–770.
- Jensen, P.O., Bjarnsholt, T., Phipps, R., Rasmussen, T.B., Calum, H., Christoffersen, L., Moser, C., Williams, P., Pressler, T., Givskov, M., *et al.* (2007). Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 153, 1329–1338.
- Jeon, K., Lim, H., Kim, J.-H., Thuan, N.V., Park, S.H., Lim, Y.-M., Choi, H.-Y., Lee, E.-R., Kim, J.-H., Lee, M.-S., *et al.* (2012). Differentiation and transplantation of functional pancreatic beta cells generated from induced pluripotent stem cells derived from a type 1 diabetes mouse model. *Stem Cells Dev.* 21, 2642–2655.
- Jia, F., Wilson, K.D., Sun, N., Gupta, D.M., Huang, M., Li, Z., Panetta, N.J., Chen, Z.Y., Robbins, R.C., Kay, M.A., *et al.* (2010). A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat. Methods* 7, 197–199.
- Jia, J., Jin, Y., Bian, T., Wu, D., Yang, L., Terada, N., Wu, W., and Jin, S. (2014). Bacterial Delivery of TALEN Proteins for Human Genome Editing. *PLoS ONE* 9, e91547.
- Jiang, J., Chan, Y.-S., Loh, Y.-H., Cai, J., Tong, G.-Q., Lim, C.-A., Robson, P., Zhong, S., and Ng, H.-H. (2008). A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 10, 353–360.
- Jin, J., Jing, W., Lei, X.-X., Feng, C., Peng, S., Boris-Lawrie, K., and Huang, Y. (2011). Evidence that Lin28 stimulates translation by recruiting RNA helicase A to polysomes. *Nucleic Acids Res.* 39, 3724–3734.
- Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., and Slack, F.J. (2005). RAS Is Regulated by the let-7 MicroRNA Family. *Cell* 120, 635–647.

- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., and Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 1864–1868.
- Judson, R.L., Babiarz, J.E., Venere, M., and Belloch, R. (2009). Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat. Biotechnol.* 27, 459–461.
- Kamao, H., Mandai, M., Okamoto, S., Sakai, N., Suga, A., Sugita, S., Kiryu, J., and Takahashi, M. (2014). Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Sheets Aiming for Clinical Application. *Stem Cell Rep.* 2, 205–218.
- Kaplan, I.M., Wadia, J.S., and Dowdy, S.F. (2005). Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 102, 247–253.
- Kaufman, M.R., Jia, J., Zeng, L., Ha, U., Chow, M., and Jin, S. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* mediated apoptosis requires the ADP-ribosylating activity of *exoS*. *Microbiol. Read. Engl.* 146 (Pt 10), 2531–2541.
- Keller, G.M. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 862–869.
- Khan, M., Narayanan, K., Lu, H., Choo, Y., Du, C., Wiradharma, N., Yang, Y.-Y., and Wan, A.C.A. (2013). Delivery of reprogramming factors into fibroblasts for generation of non-genetic induced pluripotent stem cells using a cationic bolaamphiphile as a non-viral vector. *Biomaterials* 34, 5336–5343.
- Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., *et al.* (2009a). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4, 472–476.
- Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J., and Orkin, S.H. (2008). An Extended Transcriptional Network for Pluripotency of Embryonic Stem Cells. *Cell* 132, 1049–1061.
- Kim, J.B., Sebastiano, V., Wu, G., Araúzo-Bravo, M.J., Sasse, P., Gentile, L., Ko, K., Ruau, D., Ehrich, M., van den Boom, D., *et al.* (2009b). Oct4-Induced Pluripotency in Adult Neural Stem Cells. *Cell* 136, 411–419.
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., *et al.* (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467, 285–290.
- Klemm, J.D., and Pabo, C.O. (1996). Oct-1 POU domain-DNA interactions: cooperative binding of isolated subdomains and effects of covalent linkage. *Genes Dev.* 10, 27–36.
- Klemm, J.D., Rould, M.A., Aurora, R., Herr, W., and Pabo, C.O. (1994). Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules. *Cell* 77, 21–32.
- Kottmeier, K., Ostermann, K., Bley, T., and Rödel, G. (2011). Hydrophobin signal sequence mediates efficient secretion of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 91, 133–141.
- Kühn, R., and Torres, R.M. (2002). Cre/loxP recombination system and gene targeting. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 180, 175–204.
- Kurosawa, H. (2007). Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 389–398.
- Lachmann, N., Ackermann, M., Frenzel, E., Liebhaber, S., Brenig, S., Happle, C., Hoffmann, D., Klimenkova, O., Lüttge, D., Buchegger, T., *et al.* (2015). Large-Scale Hematopoietic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells Provides Granulocytes or Macrophages for Cell Replacement Therapies. *Stem Cell Rep.* 4, 282–296.
- Lapasset, L., Milhavet, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Ait-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, J.-M., De Vos, J., *et al.* (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev.* 25, 2248–2253.

- Lapillonne, H., Kobari, L., Mazurier, C., Tropel, P., Giarratana, M.-C., Zanella-Cleon, I., Kiger, L., Wattenhofer-Donzé, M., Puccio, H., Hebert, N., *et al.* (2010). Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine. *Haematologica* 95, 1651–1659.
- Laurent, L.C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., Lynch, C., Harness, J.V., Lee, S., Barrero, M.J., *et al.* (2011). Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell* 8, 106–118.
- Lee, J., Kim, H.K., Rho, J.-Y., Han, Y.-M., and Kim, J. (2006a). The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J. Biol. Chem.* 281, 33554–33565.
- Lee, J., Sayed, N., Hunter, A., Au, K.F., Wong, W.H., Mocarski, E.S., Pera, R.R., Yakubov, E., and Cooke, J.P. (2012). Activation of innate immunity is required for efficient nuclear reprogramming. *Cell* 151, 547–558.
- Lee, T.I., Jenner, R.G., Boyer, L.A., Guenther, M.G., Levine, S.S., Kumar, R.M., Chevalier, B., Johnstone, S.E., Cole, M.F., Isono, K., *et al.* (2006b). Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 125, 301–313.
- Leid, J.G., Willson, C.J., Shirtliff, M.E., Hassett, D.J., Parsek, M.R., and Jeffers, A.K. (2005). The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 7512–7518.
- Li, N., Zhong, X., Lin, X., Guo, J., Zou, L., Tanyi, J.L., Shao, Z., Liang, S., Wang, L.-P., Hwang, W.-T., *et al.* (2012). Lin-28 Homologue A (LIN28A) Promotes Cell Cycle Progression via Regulation of Cyclin-dependent Kinase 2 (CDK2), Cyclin D1 (CCND1), and Cell Division Cycle 25 Homolog A (CDC25A) Expression in Cancer. *J. Biol. Chem.* 287, 17386–17397.
- Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., He, W., Chen, J., Li, F., Zhuang, Q., *et al.* (2010). A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 7, 51–63.
- Li, X., Zhang, P., Wei, C., and Zhang, Y. (2014). Generation of pluripotent stem cells via protein transduction. *Int. J. Dev. Biol.* 58, 21–27.
- Li, Z., Yang, C.-S., Nakashima, K., and Rana, T.M. (2011). Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation. *EMBO J.* 30, 823–834.
- Liang, J., Wan, M., Zhang, Y., Gu, P., Xin, H., Jung, S.Y., Qin, J., Wong, J., Cooney, A.J., Liu, D., *et al.* (2008). Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 10, 731–739.
- Liao, B., Bao, X., Liu, L., Feng, S., Zovoilis, A., Liu, W., Xue, Y., Cai, J., Guo, X., Qin, B., *et al.* (2011). MicroRNA Cluster 302-367 Enhances Somatic Cell Reprogramming by Accelerating a Mesenchymal-to-Epithelial Transition. *J. Biol. Chem.* 286, 17359–17364.
- Liao, W., Huang, N., Yu, J., Jares, A., Yang, J., Zieve, G., Avila, C., Jiang, X., Zhang, X.-B., and Ma, Y. (2015). Direct Conversion of Cord Blood CD34+ Cells Into Neural Stem Cells by OCT4. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 755–763.
- Lieberman, P.M., Hardwick, J.M., Sample, J., Hayward, G.S., and Hayward, S.D. (1990). The zta transactivator involved in induction of lytic cycle gene expression in Epstein-Barr virus-infected lymphocytes binds to both AP-1 and ZRE sites in target promoter and enhancer regions. *J. Virol.* 64, 1143–1155.
- Lin, S.-L., Chang, D.C., Chang-Lin, S., Lin, C.-H., Wu, D.T.S., Chen, D.T., and Ying, S.-Y. (2008). Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA N. Y. N* 14, 2115–2124.

- Lin, S.-L., Chang, D.C., Lin, C.-H., Ying, S.-Y., Leu, D., and Wu, D.T.S. (2011). Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression. *Nucleic Acids Res.* 39, 1054–1065.
- Loh, Y.-H., Agarwal, S., Park, I.-H., Urbach, A., Huo, H., Heffner, G.C., Kim, K., Miller, J.D., Ng, K., and Daley, G.Q. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113, 5476–5479.
- Lundberg, P., and Langel, U. (2003). A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J. Mol. Recognit. JMR* 16, 227–233.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L., and Pier, G.B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 2, 1051–1060.
- Macarthur, C.C., Fontes, A., Ravinder, N., Kuninger, D., Kaur, J., Bailey, M., Taliana, A., Vemuri, M.C., and Lieu, P.T. (2012). Generation of human-induced pluripotent stem cells by a nonintegrating RNA Sendai virus vector in feeder-free or xeno-free conditions. *Stem Cells Int.* 2012, 564612.
- Madani, F., Lindberg, S., Langel, U., Futaki, S., and Gräslund, A. (2011). Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J. Biophys. Hindawi Publ. Corp. Online* 2011, 414729.
- Maeda, T., Lee, M.J., Palczewska, G., Marsili, S., Tesar, P.J., Palczewski, K., Takahashi, M., and Maeda, A. (2013). Retinal Pigmented Epithelial Cells Obtained from Human Induced Pluripotent Stem Cells Possess Functional Visual Cycle Enzymes in Vitro and in Vivo. *J. Biol. Chem.* 288, 34484–34493.
- Maherali, N., and Hochedlinger, K. (2009). Tgfb β Signal Inhibition Cooperates in the Induction of iPSCs and Replaces Sox2 and cMyc. *Curr. Biol.* 19, 1718–1723.
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., *et al.* (2007). Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution. *Cell Stem Cell* 1, 55–70.
- Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C., and Hochedlinger, K. (2008). A High-Efficiency System for the Generation and Study of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 3, 340–345.
- Mahot, S., Fender, P., Vivès, R.R., Caron, C., Perrissin, M., Gruffat, H., Sergeant, A., and Drouet, E. (2005). Cellular uptake of the EBV transcription factor EB1/Zta. *Virus Res.* 110, 187–193.
- Mali, P., Chou, B.-K., Yen, J., Ye, Z., Zou, J., Dowey, S., Brodsky, R.A., Ohm, J.E., Yu, W., Baylin, S.B., *et al.* (2010). Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes. *Stem Cells Dayt. Ohio* 28, 713–720.
- Mansour, A.A., Gafni, O., Weinberger, L., Zviran, A., Ayyash, M., Rais, Y., Krupalnik, V., Zerbib, M., Amann-Zalcenstein, D., Maza, I., *et al.* (2012). The H3K27 demethylase Utx regulates somatic and germ cell epigenetic reprogramming. *Nature* 488, 409–413.
- Marchetto, M.C.N., Yeo, G.W., Kainohana, O., Marsala, M., Gage, F.H., and Muotri, A.R. (2009). Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PloS One* 4, e7076.
- Marchione, R., Laurin, D., Liguori, L., Leibovitch, M.P., Leibovitch, S.A., and Lenormand, J.-L. (2015). MD11-mediated delivery of recombinant eIF3f induces melanoma and colorectal carcinoma cell death. *Mol. Ther. — Methods Clin. Dev.* 2, 14056.
- Marson, A., Levine, S.S., Cole, M.F., Frampton, G.M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M.G., Johnston, W.K., Wernig, M., Newman, J., *et al.* (2008). Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* 134, 521–533.

- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 7634–7638.
- Martinato, F., Cesaroni, M., Amati, B., and Guccione, E. (2008). Analysis of Myc-induced histone modifications on target chromatin. *PloS One* 3, e3650.
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., *et al.* (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 625–635.
- Mathieu, J., Zhou, W., Xing, Y., Sperber, H., Ferreccio, A., Agoston, Z., Kuppusamy, K.T., Moon, R.T., and Ruohola-Baker, H. (2014). Hypoxia-inducible factors have distinct and stage-specific roles during reprogramming of human cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 14, 592–605.
- Matin, M.M. (2004). Specific Knockdown of Oct4 and 2-microglobulin Expression by RNA Interference in Human Embryonic Stem Cells and Embryonic Carcinoma Cells. *Stem Cells* 22, 659–668.
- Matusiak, M., Van Opdenbosch, N., Vande Walle, L., Sirard, J.-C., Kanneganti, T.-D., and Lamkanfi, M. (2015). Flagellin-induced NLRC4 phosphorylation primes the inflammasome for activation by NAIP5. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 1541–1546.
- Mayshar, Y., Ben-David, U., Lavon, N., Biancotti, J.-C., Yakir, B., Clark, A.T., Plath, K., Lowry, W.E., and Benvenisty, N. (2010). Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 521–531.
- McCaw, M.L., Lykken, G.L., Singh, P.K., and Yahr, T.L. (2002). ExsD is a negative regulator of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion regulon: Negative regulatory activity of ExsD. *Mol. Microbiol.* 46, 1123–1133.
- Melton, C., Judson, R.L., and Blelloch, R. (2010). Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* 463, 621–626.
- Menendez, S., Camus, S., and Belmonte, J.C.I. (2010). p53: Guardian of reprogramming. *Cell Cycle* 9, 3887–3891.
- Meng, X., Neises, A., Su, R.-J., Payne, K.J., Ritter, L., Gridley, D.S., Wang, J., Sheng, M., Lau, K.-H.W., Baylink, D.J., *et al.* (2012). Efficient reprogramming of human cord blood CD34+ cells into induced pluripotent stem cells with OCT4 and SOX2 alone. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 20, 408–416.
- Meyers, D.J., Palmer, K.C., Bale, L.A., Kernacki, K., Preston, M., Brown, T., and Berk, R.S. (1992). In vivo and in vitro toxicity of phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 30, 161–169.
- Miao, E.A., Leaf, I.A., Treuting, P.M., Mao, D.P., Dors, M., Sarkar, A., Warren, S.E., Wewers, M.D., and Aderem, A. (2010). Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat. Immunol.* 11, 1136–1142.
- Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., Lander, E.S., and Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454, 49–55.
- Mills, R.E., Bennett, E.A., Iskow, R.C., and Devine, S.E. (2007). Which transposable elements are active in the human genome? *Trends Genet.* 23, 183–191.
- Mirakhori, F., Zeynali, B., Rassouli, H., Salekdeh, G.H., and Baharvand, H. (2015). Direct conversion of human fibroblasts into dopaminergic neural progenitor-like cells using TAT-mediated protein transduction of recombinant factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 459, 655–661.

- Mitchell, D.J., Kim, D.T., Steinman, L., Fathman, C.G., and Rothbard, J.B. (2000). Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J. Pept. Res. Off. J. Am. Pept. Soc.* *56*, 318–325.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* *113*, 631–642.
- Miyoshi, N., Ishii, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Dewi, D.L., Kano, Y., Nishikawa, S., Tanemura, M., Mimori, K., Tanaka, F., *et al.* (2011). Reprogramming of Mouse and Human Cells to Pluripotency Using Mature MicroRNAs. *Cell Stem Cell* *8*, 633–638.
- Morizane, A., Doi, D., Kikuchi, T., Okita, K., Hotta, A., Kawasaki, T., Hayashi, T., Onoe, H., Shiina, T., Yamanaka, S., *et al.* (2013). Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of iPSC-derived neural cells in the brain of a non-human primate. *Stem Cell Rep.* *1*, 283–292.
- Moss, E.G., Lee, R.C., and Ambros, V. (1997). The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell* *88*, 637–646.
- Mullin, N.P., Yates, A., Rowe, A.J., Nijmeijer, B., Colby, D., Barlow, P.N., Walkinshaw, M.D., and Chambers, I. (2008). The pluripotency rheostat Nanog functions as a dimer. *Biochem. J.* *411*, 227.
- Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J.C., *et al.* (2004). Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *10*, 1011–1022.
- Nakatake, Y., Fukui, N., Iwamatsu, Y., Masui, S., Takahashi, K., Yagi, R., Yagi, K., Miyazaki, J. -i., Matoba, R., Ko, M.S.H., *et al.* (2006). Klf4 Cooperates with Oct3/4 and Sox2 To Activate the Lefty1 Core Promoter in Embryonic Stem Cells. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 7772–7782.
- Naskalska, A., Szolajska, E., Chaperot, L., Angel, J., Plumas, J., and Chroboczek, J. (2009). Influenza recombinant vaccine: matrix protein M1 on the platform of the adenovirus dodecahedron. *Vaccine* *27*, 7385–7393.
- Neeld, D., Jin, Y., Bichsel, C., Jia, J., Guo, J., Bai, F., Wu, W., Ha, U.-H., Terada, N., and Jin, S. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* injects NDK into host cells through a type III secretion system. *Microbiol. Read. Engl.* *160*, 1417–1426.
- Nemes, C., Varga, E., Polgar, Z., Klincumhom, N., Purity, M.K., and Dinnyes, A. (2014). Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells by Protein Transduction. *Tissue Eng. Part C Methods* *20*, 383–392.
- Neri, F., Zippo, A., Krepelova, A., Cherubini, A., Rocchigiani, M., and Oliviero, S. (2012). Myc regulates the transcription of the PRC2 gene to control the expression of developmental genes in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 840–851.
- Nesbit, C.E., Tersak, J.M., and Prochownik, E.V. (1999). MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* *18*, 3004–3016.
- Newman, M.A., Thomson, J.M., and Hammond, S.M. (2008). Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA N. Y. N* *14*, 1539–1549.
- Nikiforov, M.A., Chandriani, S., Park, J., Kotenko, I., Matheos, D., Johnsson, A., McMahon, S.B., and Cole, M.D. (2002). TRRAP-Dependent and TRRAP-Independent Transcriptional Activation by Myc Family Oncoproteins. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 5054–5063.
- Nishimoto, M., Fukushima, A., Okuda, A., and Muramatsu, M. (1999a). The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 5453–5465.

- Nishimoto, M., Fukushima, A., Okuda, A., and Muramatsu, M. (1999b). The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5453–5465.
- Nishimura, K., Sano, M., Ohtaka, M., Furuta, B., Umemura, Y., Nakajima, Y., Ikehara, Y., Kobayashi, T., Segawa, H., Takayasu, S., *et al.* (2011). Development of Defective and Persistent Sendai Virus Vector: A UNIQUE GENE DELIVERY/EXPRESSION SYSTEM IDEAL FOR CELL REPROGRAMMING. *J. Biol. Chem.* 286, 4760–4771.
- Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development* 134, 635–646.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24, 372–376.
- O'Connor, M.D., Kardel, M.D., Iosfina, I., Youssef, D., Lu, M., Li, M.M., Vercauteren, S., Nagy, A., and Eaves, C.J. (2008). Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 1109–1116.
- Oehlke, J., Scheller, A., Wiesner, B., Krause, E., Beyermann, M., Klauschenz, E., Melzig, M., and Bienert, M. (1998). Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim. Biophys. Acta* 1414, 127–139.
- Oh, J.-H., Do, H.-J., Yang, H.-M., Moon, S.-Y., Cha, K.-Y., Chung, H.-M., and Kim, J.-H. (2005a). Identification of a putative transactivation domain in human Nanog. *Exp. Mol. Med.* 37, 250–254.
- Oh, S.K., Kim, H.S., Park, Y.B., Seol, H.W., Kim, Y.Y., Cho, M.S., Ku, S.Y., Choi, Y.M., Kim, D.-W., and Moon, S.Y. (2005b). Methods for Expansion of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 23, 605–609.
- Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M., and Hamada, H. (1990). A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 60, 461–472.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247–257.
- Okawa, T., Kamiya, H., Himeno, T., Kato, J., Seino, Y., Fujiya, A., Kondo, M., Tsunekawa, S., Naruse, K., Hamada, Y., *et al.* (2013). Transplantation of neural crest-like cells derived from induced pluripotent stem cells improves diabetic polyneuropathy in mice. *Cell Transplant.* 22, 1767–1783.
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313–317.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322, 949–953.
- Okita, K., Nagata, N., and Yamanaka, S. (2011). Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Circ. Res.* 109, 720–721.
- Okita, K., Yamakawa, T., Matsumura, Y., Sato, Y., Amano, N., Watanabe, A., Goshima, N., and Yamanaka, S. (2013). An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 31, 458–466.
- Okumura-Nakanishi, S., Saito, M., Niwa, H., and Ishikawa, F. (2005). Oct-3/4 and Sox2 Regulate Oct-3/4 Gene in Embryonic Stem Cells. *J. Biol. Chem.* 280, 5307–5317.
- Onder, T.T., Kara, N., Cherry, A., Sinha, A.U., Zhu, N., Bernt, K.M., Cahan, P., Marcarci, B.O., Unternaehrer, J., Gupta, P.B., *et al.* (2012). Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature* 483, 598–602.

- Ostberg, J.R., Barth, R.K., and Frelinger, J.G. (1998). The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43. *Immunol. Today* 19, 546–550.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 30, 295–304.
- Pan, G., and Pei, D. (2005). The Stem Cell Pluripotency Factor NANOG Activates Transcription with Two Unusually Potent Subdomains at Its C Terminus. *J. Biol. Chem.* 280, 1401–1407.
- Panopoulos, A.D., Yanes, O., Ruiz, S., Kida, Y.S., Diep, D., Tautenhahn, R., Herrerías, A., Batchelder, E.M., Plongthongkum, N., Lutz, M., *et al.* (2012). The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res.* 22, 168–177.
- Park, H., Kim, D., Kim, C.-H., Mills, R.E., Chang, M.-Y., Iskow, R.C., Ko, S., Moon, J.-I., Choi, H.W., Man Yoo, P.S., *et al.* (2014). Increased genomic integrity of an improved protein-based mouse induced pluripotent stem cell method compared with current viral-induced strategies. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 599–609.
- Pastor, A., Chabert, J., Louwagie, M., Garin, J., and Attree, I. (2005). PscF is a major component of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion needle. *FEMS Microbiol. Lett.* 253, 95–101.
- Pearson, J.P., Feldman, M., Iglewski, B.H., and Prince, A. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. *Infect. Immun.* 68, 4331–4334.
- Pedersen, B.K., and Kharazmi, A. (1987). Inhibition of human natural killer cell activity by *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease and elastase. *Infect. Immun.* 55, 986–989.
- Pederson, K.J., and Barbieri, J.T. (1998). Intracellular expression of the ADP-ribosyltransferase domain of *Pseudomonas* exoenzyme S is cytotoxic to eukaryotic cells. *Mol. Microbiol.* 30, 751–759.
- Peng, S., Chen, L.-L., Lei, X.-X., Yang, L., Lin, H., Carmichael, G.G., and Huang, Y. (2011). Genome-Wide Studies Reveal That Lin28 Enhances the Translation of Genes Important for Growth and Survival of Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* 29, 496–504.
- Pereira, C.F., Terranova, R., Ryan, N.K., Santos, J., Morris, K.J., Cui, W., Merckenschlager, M., and Fisher, A.G. (2008). Heterokaryon-based reprogramming of human B lymphocytes for pluripotency requires Oct4 but not Sox2. *PLoS Genet.* 4, e1000170.
- Phillips, R.M. (2003). In Vivo Phospholipase Activity of the *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU and Protection of Mammalian Cells with Phospholipase A2 Inhibitors. *J. Biol. Chem.* 278, 41326–41332.
- Pier, G.B. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* 297, 277–295.
- Piskounova, E., Polyarchou, C., Thornton, J.E., LaPierre, R.J., Pothoulakis, C., Hagan, J.P., Iliopoulos, D., and Gregory, R.I. (2011). Lin28A and Lin28B inhibit let-7 microRNA biogenesis by distinct mechanisms. *Cell* 147, 1066–1079.
- Polesskaya, A., Cuvellier, S., Naguibneva, I., Duquet, A., Moss, E.G., and Harel-Bellan, A. (2007). Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. *Genes Dev.* 21, 1125–1138.
- Polo, J.M., Anderssen, E., Walsh, R.M., Schwarz, B.A., Nefzger, C.M., Lim, S.M., Borkent, M., Apostolou, E., Alaei, S., Cloutier, J., *et al.* (2012). A Molecular Roadmap of Reprogramming Somatic Cells into iPS Cells. *Cell* 151, 1617–1632.
- Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M., and Langel, U. (1998). Cell penetration by transportan. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 12, 67–77.

- Pouya, A., Satarian, L., Kiani, S., Javan, M., and Baharvand, H. (2011). Human induced pluripotent stem cells differentiation into oligodendrocyte progenitors and transplantation in a rat model of optic chiasm demyelination. *PloS One* 6, e27925.
- Quénée, L., Lamotte, D., and Polack, B. (2005). Combined sacB-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *pseudomonas aeruginosa*. *BioTechniques* 38, 63–67.
- Radcliffe, P.A., and Mitrophanous, K.A. (2004). Multiple gene products from a single vector: “self-cleaving” 2A peptides. *Gene Ther.* 11, 1673–1674.
- Ramos-Mejía, V., Montes, R., Bueno, C., Ayllón, V., Real, P.J., Rodríguez, R., and Menendez, P. (2012). Residual expression of the reprogramming factors prevents differentiation of iPSC generated from human fibroblasts and cord blood CD34+ progenitors. *PloS One* 7, e35824.
- Raoust, E., Balloy, V., Garcia-Verdugo, I., Touqui, L., Ramphal, R., and Chignard, M. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* LPS or Flagellin Are Sufficient to Activate TLR-Dependent Signaling in Murine Alveolar Macrophages and Airway Epithelial Cells. *PLoS ONE* 4, e7259.
- Rasmussen, M.A., Holst, B., Tümer, Z., Johnsen, M.G., Zhou, S., Stummann, T.C., Hyttel, P., and Clausen, C. (2014). Transient p53 Suppression Increases Reprogramming of Human Fibroblasts without Affecting Apoptosis and DNA Damage. *Stem Cell Rep.* 3, 404–413.
- Reardon, S., and Cyranoski, D. (2014). Japan stem-cell trial stirs envy. *Nature* 513, 287–288.
- Reik, W. (2007). Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447, 425–432.
- Reimer, J.J., and Turck, F. (2010). Genome-wide mapping of protein-DNA interaction by chromatin immunoprecipitation and DNA microarray hybridization (ChIP-chip). Part A: ChIP-chip molecular methods. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 631, 139–160.
- Remenyi, A. (2003). Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes Dev.* 17, 2048–2059.
- Remy, I., Ghaddar, G., and Michnick, S.W. (2007). Using the β -lactamase protein-fragment complementation assay to probe dynamic protein–protein interactions. *Nat. Protoc.* 2, 2302–2306.
- Richard, J.P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M.J., Chernomordik, L.V., and Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* 278, 585–590.
- Richard, J.P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B., and Chernomordik, L.V. (2005). Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J. Biol. Chem.* 280, 15300–15306.
- Robb, L. (2007). Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* 26, 6715–6723.
- Robinton, D.A., and Daley, G.Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481, 295–305.
- Rodda, D.J., Chew, J.-L., Lim, L.-H., Loh, Y.-H., Wang, B., Ng, H.-H., and Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J. Biol. Chem.* 280, 24731–24737.
- Rodríguez-Pizà, I., Richaud-Patin, Y., Vassena, R., González, F., Barrero, M.J., Veiga, A., Raya, A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2009). Reprogramming of Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells Under Xeno-Free Conditions. *Stem Cells* N/A – N/A.

- Roelvink, P.W., Lizonova, A., Lee, J.G., Li, Y., Bergelson, J.M., Finberg, R.W., Brough, D.E., Kovesdi, I., and Wickham, T.J. (1998). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* 72, 7909–7915.
- Rosner, M.H., Vigano, M.A., Ozato, K., Timmons, P.M., Poirier, F., Rigby, P.W., and Staudt, L.M. (1990). A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 345, 686–692.
- Rothbard, J.B., Garlington, S., Lin, Q., Kirschberg, T., Kreider, E., McGrane, P.L., Wender, P.A., and Khavari, P.A. (2000). Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat. Med.* 6, 1253–1257.
- Rothe, R., Liguori, L., Villegas-Mendez, A., Marques, B., Grunwald, D., Drouet, E., and Lenormand, J.-L. (2010). Characterization of the cell-penetrating properties of the Epstein-Barr virus ZEBRA trans-activator. *J. Biol. Chem.* 285, 20224–20233.
- Samavarchi-Tehrani, P., Golipour, A., David, L., Sung, H.-K., Beyer, T.A., Datti, A., Woltjen, K., Nagy, A., and Wrana, J.L. (2010). Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 7, 64–77.
- Sampson, V.B., Rong, N.H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, N.J., Dunn, S.P., and Krueger, L.J. (2007). MicroRNA Let-7a Down-regulates MYC and Reverts MYC-Induced Growth in Burkitt Lymphoma Cells. *Cancer Res.* 67, 9762–9770.
- Saraiva, N.Z. (2010). Histone acetylation and its role in embryonic stem cell differentiation. *World J. Stem Cells* 2, 121.
- Sato, H., Frank, D.W., Hillard, C.J., Feix, J.B., Pankhaniya, R.R., Moriyama, K., Finck-Barbançon, V., Buchaklian, A., Lei, M., Long, R.M., *et al.* (2003). The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J.* 22, 2959–2969.
- Sawan, C., Hernandez-Vargas, H., Murr, R., Lopez, F., Vaissière, T., Ghantous, A.Y., Cuenin, C., Imbert, J., Wang, Z.-Q., Ren, B., *et al.* (2013). Histone Acetyltransferase Cofactor Trrap Maintains Self-Renewal and Restricts Differentiation of Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* 31, 979–991.
- Schlaeger, T.M., Daheron, L., Brickler, T.R., Entwisle, S., Chan, K., Cianci, A., DeVine, A., Ettenger, A., Fitzgerald, K., Godfrey, M., *et al.* (2014). A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat. Biotechnol.*
- Schoehn, G., Di Guilmi, A.M., Lemaire, D., Attree, I., Weissenhorn, W., and Dessen, A. (2003). Oligomerization of type III secretion proteins PopB and PopD precedes pore formation in *Pseudomonas*. *EMBO J.* 22, 4957–4967.
- Schöler, H.R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K., and Gruss, P. (1990). New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344, 435–439.
- Scott, C.W., Peters, M.F., and Dragan, Y.P. (2013). Human induced pluripotent stem cells and their use in drug discovery for toxicity testing. *Toxicol. Lett.* 219, 49–58.
- Seaberg, R.M., and van der Kooy, D. (2002). Adult rodent neurogenic regions: the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 1784–1793.
- Seki, T., Yuasa, S., Oda, M., Egashira, T., Yae, K., Kusumoto, D., Nakata, H., Tohyama, S., Hashimoto, H., Kodaira, M., *et al.* (2010). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Terminally Differentiated Circulating T Cells. *Cell Stem Cell* 7, 11–14.

- Seth, P. (1994). Adenovirus-dependent release of choline from plasma membrane vesicles at an acidic pH is mediated by the penton base protein. *J. Virol.* 68, 1204–1206.
- Shafikhani, S.H., Morales, C., and Engel, J. (2008). The *Pseudomonas aeruginosa* type III secreted toxin ExoT is necessary and sufficient to induce apoptosis in epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 10, 994–1007.
- Shaver, C.M., and Hauser, A.R. (2004). Relative Contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to Virulence in the Lung. *Infect. Immun.* 72, 6969–6977.
- Shen, D.-K., Quenee, L., Bonnet, M., Kuhn, L., Derouazi, M., Lamotte, D., Toussaint, B., and Polack, B. (2008). Orf1/SpcS chaperones ExoS for type three secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biomed. Environ. Sci. BES* 21, 103–109.
- Sheridan, S.D., Surampudi, V., and Rao, R.R. (2012). Analysis of Embryoid Bodies Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells as a Means to Assess Pluripotency. *Stem Cells Int.* 2012, 1–9.
- Shi, Y., Despons, C., Do, J.T., Hahm, H.S., Schöler, H.R., and Ding, S. (2008). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic Fibroblasts by Oct4 and Klf4 with Small-Molecule Compounds. *Cell Stem Cell* 3, 568–574.
- Shields, J.M., and Yang, V.W. (1998). Identification of the DNA sequence that interacts with the gut-enriched Krüppel-like factor. *Nucleic Acids Res.* 26, 796–802.
- Shu, X., and Pei, D. (2014). The function and regulation of mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 28, 32–37.
- Shyh-Chang, N., Daley, G.Q., and Cantley, L.C. (2013). Stem cell metabolism in tissue development and aging. *Development* 140, 2535–2547.
- Sliwinski-Korell, A., Engelhardt, H., Kampka, M., and Lutz, F. (1999). Oligomerization and structural changes of the pore-forming *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin. *Eur. J. Biochem. FEBS* 265, 221–230.
- Smith, K.N., Singh, A.M., and Dalton, S. (2010). Myc Represses Primitive Endoderm Differentiation in Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 7, 343–354.
- Somers, A., Jean, J.-C., Sommer, C.A., Omari, A., Ford, C.C., Mills, J.A., Ying, L., Sommer, A.G., Jean, J.M., Smith, B.W., *et al.* (2010). Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells Dayt. Ohio* 28, 1728–1740.
- Soufi, A., and Zaret, K.S. (2013). Understanding impediments to cellular conversion to pluripotency by assessing the earliest events in ectopic transcription factor binding to the genome. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 1487–1491.
- Soufi, A., Donahue, G., and Zaret, K.S. (2012). Facilitators and Impediments of the Pluripotency Reprogramming Factors' Initial Engagement with the Genome. *Cell* 151, 994–1004.
- Soza-Ried, J., and Fisher, A.G. (2012). Reprogramming somatic cells towards pluripotency by cellular fusion. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 22, 459–465.
- Sridharan, R., Tchieu, J., Mason, M.J., Yachechko, R., Kuoy, E., Horvath, S., Zhou, Q., and Plath, K. (2009). Role of the Murine Reprogramming Factors in the Induction of Pluripotency. *Cell* 136, 364–377.
- Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D.T., and Hochedlinger, K. (2008a). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2, 230–240.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008b). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945–949.

- Stadtfeld, M., Apostolou, E., Akutsu, H., Fukuda, A., Follett, P., Natesan, S., Kono, T., Shioda, T., and Hochedlinger, K. (2010). Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* **465**, 175–181.
- Stephen, S.L., Sivanandam, V.G., and Kochanek, S. (2008). Homologous and heterologous recombination between adenovirus vector DNA and chromosomal DNA. *J. Gene Med.* **10**, 1176–1189.
- Strateva, T., and Mitov, I. (2011). Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann. Microbiol.* **61**, 717–732.
- Subramanyam, D., Lamouille, S., Judson, R.L., Liu, J.Y., Bucay, N., Derynck, R., and Blelloch, R. (2011). Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **29**, 443–448.
- Suda, T., Arai, F., and Hirao, A. (2005). Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends Immunol.* **26**, 426–433.
- Sun, J., Mandai, M., Kamao, H., Hashiguchi, T., Shikamura, M., Kawamata, S., Sugita, S., and Takahashi, M. (2015). Protective Effects of Human iPS-Derived Retinal Pigmented Epithelial Cells in Comparison with Human Mesenchymal Stromal Cells and Human Neural Stem Cells on the Degenerating Retina in rd1 mice. *Stem Cells Dayt. Ohio* **33**, 1543–1553.
- Suzuki, N., Yamazaki, S., Yamaguchi, T., Okabe, M., Masaki, H., Takaki, S., Otsu, M., and Nakauchi, H. (2013). Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **21**, 1424–1431.
- Suzuki, T., Futaki, S., Niwa, M., Tanaka, S., Ueda, K., and Sugiura, Y. (2002). Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *J. Biol. Chem.* **277**, 2437–2443.
- Szabo, E., Rampalli, S., Risueño, R.M., Schnerch, A., Mitchell, R., Fiebig-Comyn, A., Levadoux-Martin, M., and Bhatia, M. (2010). Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* **468**, 521–526.
- Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H.-S., Sritanandomchai, H., *et al.* (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* **153**, 1228–1238.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**, 861–872.
- Takebe, T., Zhang, R.-R., Koike, H., Kimura, M., Yoshizawa, E., Enomura, M., Koike, N., Sekine, K., and Taniguchi, H. (2014). Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nat. Protoc.* **9**, 396–409.
- Takeda, J., Seino, S., and Bell, G.I. (1992). Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res.* **20**, 4613–4620.
- Takenaka, C., Nishishita, N., Takada, N., Jakt, L.M., and Kawamata, S. (2010). Effective generation of iPS cells from CD34+ cord blood cells by inhibition of p53. *Exp. Hematol.* **38**, 154–162.
- Takizawa, H., Schanz, U., and Manz, M. (2011). Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells: mission accomplished? *Swiss Med. Wkly.*

- Tanabe, K., Nakamura, M., Narita, M., Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2013). Maturation, not initiation, is the major roadblock during reprogramming toward pluripotency from human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 12172–12179.
- Temin, H.M. (1982). Function of the retrovirus long terminal repeat. *Cell* *28*, 3–5.
- Thier, M., Müntz, B., Mielke, S., and Edenhofer, F. (2012). Cellular Reprogramming Employing Recombinant Sox2 Protein. *Stem Cells Int.* *2012*, 1–10.
- Thomson, J.A. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* *282*, 1145–1147.
- Thomson, J.A., and Marshall, V.S. (1998). Primate embryonic stem cells. *Curr. Top. Dev. Biol.* *38*, 133–165.
- Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Becker, R.A., and Hearn, J.P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 7844–7848.
- Toder, D.S., Ferrell, S.J., Nezezon, J.L., Rust, L., and Iglewski, B.H. (1994). *lasA* and *lasB* genes of *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of transcription and gene product activity. *Infect. Immun.* *62*, 1320–1327.
- Tomioka, M., Nishimoto, M., Miyagi, S., Katayanagi, T., Fukui, N., Niwa, H., Muramatsu, M., and Okuda, A. (2002). Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res.* *30*, 3202–3213.
- Torrents, D., Suyama, M., Zdobnov, E., and Bork, P. (2003). A genome-wide survey of human pseudogenes. *Genome Res.* *13*, 2559–2567.
- Toussaint, B., Delic-Attree, I., and Vignais, P.M. (1993). *Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the *algD* promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *196*, 416–421.
- Urbanowski, M.L., Lykken, G.L., and Yahr, T.L. (2005). A secreted regulatory protein couples transcription to the secretory activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 9930–9935.
- Valente, E., Assis, M.C., Alvim, I.M., Pereira, G.M., and Plotkowski, M.C. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* induces apoptosis in human endothelial cells. *Microb. Pathog.* *29*, 345–356.
- Vallis, A.J., Yahr, T.L., Barbieri, J.T., and Frank, D.W. (1999). Regulation of ExoS production and secretion by *Pseudomonas aeruginosa* in response to tissue culture conditions. *Infect. Immun.* *67*, 914–920.
- Varga, M.J., Weibull, C., and Everitt, E. (1991). Infectious entry pathway of adenovirus type 2. *J. Virol.* *65*, 6061–6070.
- Venturi, V. (2006). Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol. Rev.* *30*, 274–291.
- Verove, J., Bernarde, C., Bohn, Y.-S.T., Boulay, F., Rabet, M.-J., Attree, I., and Cretin, F. (2012). Injection of *Pseudomonas aeruginosa* Exo toxins into host cells can be modulated by host factors at the level of translocon assembly and/or activity. *PloS One* *7*, e30488.
- Victor, M.B., Richner, M., Hermansteyne, T.O., Ransdell, J.L., Sobieski, C., Deng, P.-Y., Klyachko, V.A., Nerbonne, J.M., and Yoo, A.S. (2014). Generation of human striatal neurons by microRNA-dependent direct conversion of fibroblasts. *Neuron* *84*, 311–323.
- Villegas-Mendez, A., Garin, M.I., Pineda-Molina, E., Veratti, E., Bueren, J.A., Fender, P., and Lenormand, J.-L. (2010). In Vivo Delivery of Antigens by Adenovirus Dodecahedron Induces Cellular and Humoral Immune Responses to Elicit Antitumor Immunity. *Mol. Ther.* *18*, 1046–1053.

- Villegas-Méndez, A., Fender, P., Garin, M.I., Rothe, R., Liguori, L., Marques, B., and Lenormand, J.-L. (2012). Functional characterisation of the WW minimal domain for delivering therapeutic proteins by adenovirus dodecahedron. *PloS One* 7, e45416.
- Viswanathan, S.R., Daley, G.Q., and Gregory, R.I. (2008). Selective Blockade of MicroRNA Processing by Lin28. *Science* 320, 97–100.
- Vivès, E., Brodin, P., and Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* 272, 16010–16017.
- Vivès, R.R., Lortat-Jacob, H., Chroboczek, J., and Fender, P. (2004). Heparan sulfate proteoglycan mediates the selective attachment and internalization of serotype 3 human adenovirus dodecahedron. *Virology* 321, 332–340.
- Wakayama, T., Tabar, V., Rodriguez, I., Perry, A.C., Studer, L., and Mombaerts, P. (2001). Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 292, 740–743.
- Wallbrecher, R., Verdurmen, W.P.R., Schmidt, S., Bovee-Geurts, P.H., Broecker, F., Reinhardt, A., van Kuppevelt, T.H., Seeberger, P.H., and Brock, R. (2014). The stoichiometry of peptide-heparan sulfate binding as a determinant of uptake efficiency of cell-penetrating peptides. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 71, 2717–2729.
- Wang, H., Li, Z.-Y., Liu, Y., Persson, J., Beyer, I., Möller, T., Koyuncu, D., Drescher, M.R., Strauss, R., Zhang, X.-B., *et al.* (2011a). Desmoglein 2 is a receptor for adenovirus serotypes 3, 7, 11 and 14. *Nat. Med.* 17, 96–104.
- Wang, T., Chen, K., Zeng, X., Yang, J., Wu, Y., Shi, X., Qin, B., Zeng, L., Esteban, M.A., Pan, G., *et al.* (2011b). The Histone Demethylases Jhdm1a/1b Enhance Somatic Cell Reprogramming in a Vitamin-C-Dependent Manner. *Cell Stem Cell* 9, 575–587.
- Wang, W., Lin, C., Lu, D., Ning, Z., Cox, T., Melvin, D., Wang, X., Bradley, A., and Liu, P. (2008). Chromosomal transposition of PiggyBac in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9290–9295.
- Wang, Y., Gouëllec, A.L., Chaker, H., Asrih, H., Polack, B., and Toussaint, B. (2012a). Optimization of antitumor immunotherapy mediated by type III secretion system-based live attenuated bacterial vectors. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997* 35, 223–234.
- Wang, Y., Liu, J., Tan, X., Li, G., Gao, Y., Liu, X., Zhang, L., and Li, Y. (2013). Induced pluripotent stem cells from human hair follicle mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev.* 9, 451–460.
- Wang, Z., Oron, E., Nelson, B., Razis, S., and Ivanova, N. (2012b). Distinct Lineage Specification Roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 10, 440–454.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., *et al.* (2010). Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7, 618–630.
- Wei, D., Gong, W., Kanai, M., Schlunk, C., Wang, L., Yao, J.C., Wu, T.-T., Huang, S., and Xie, K. (2005). Drastic down-regulation of Krüppel-like factor 4 expression is critical in human gastric cancer development and progression. *Cancer Res.* 65, 2746–2754.
- Wickham, T.J., Mathias, P., Cheresch, D.A., and Nemerow, G.R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73, 309–319.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813.

- Wobus, A.M. (2005). Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Physiol. Rev.* 85, 635–678.
- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., *et al.* (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766–770.
- Wu, S.M., and Hochedlinger, K. (2011). Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat. Cell Biol.* 13, 497–505.
- Xiong, G., Struckmeier, M., and Lutz, F. (1994). Pore-forming *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin. *Toxicology* 87, 69–83.
- Xu, B., Zhang, K., and Huang, Y. (2009). Lin28 modulates cell growth and associates with a subset of cell cycle regulator mRNAs in mouse embryonic stem cells. *RNA* 15, 357–361.
- Yahr, T.L., and Wolfgang, M.C. (2006). Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol. Microbiol.* 62, 631–640.
- Yahr, T.L., Vallis, A.J., Hancock, M.K., Barbieri, J.T., and Frank, D.W. (1998). ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 13899–13904.
- Yakubov, E., Rechavi, G., Rozenblatt, S., and Givol, D. (2010). Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394, 189–193.
- Yamamoto, K., Kishida, T., Sato, Y., Nishioka, K., Ejima, A., Fujiwara, H., Kubo, T., Yamamoto, T., Kanamura, N., and Mazda, O. (2015). Direct conversion of human fibroblasts into functional osteoblasts by defined factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 6152–6157.
- Yamanaka, S., and Blau, H.M. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465, 704–712.
- Yang, R., Zheng, Y., Li, L., Liu, S., Burrows, M., Wei, Z., Nace, A., Herlyn, M., Cui, R., Guo, W., *et al.* (2014). Direct conversion of mouse and human fibroblasts to functional melanocytes by defined factors. *Nat. Commun.* 5, 5807.
- Ye, L., Muench, M.O., Fusaki, N., Beyer, A.I., Wang, J., Qi, Z., Yu, J., and Kan, Y.W. (2013). Blood cell-derived induced pluripotent stem cells free of reprogramming factors generated by Sendai viral vectors. *Stem Cells Transl. Med.* 2, 558–566.
- Yet, S.F., McA’Nulty, M.M., Folta, S.C., Yen, H.W., Yoshizumi, M., Hsieh, C.M., Layne, M.D., Chin, M.T., Wang, H., Perrella, M.A., *et al.* (1998). Human EZF, a Krüppel-like zinc finger protein, is expressed in vascular endothelial cells and contains transcriptional activation and repression domains. *J. Biol. Chem.* 273, 1026–1031.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17, 3011–3016.
- Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol. Rev.* 93, 23–67.
- Yonemitsu, Y., Kitson, C., Ferrari, S., Farley, R., Griesenbach, U., Judd, D., Steel, R., Scheid, P., Zhu, J., Jeffery, P.K., *et al.* (2000). Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat. Biotechnol.* 18, 970–973.
- Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2009). Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 237–241.

- Young, R.A. (2011). Control of the Embryonic Stem Cell State. *Cell* 144, 940–954.
- Young, L.S., and Rickinson, A.B. (2004). Epstein–Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer* 4, 757–768.
- Yu, F., Yao, H., Zhu, P., Zhang, X., Pan, Q., Gong, C., Huang, Y., Hu, X., Su, F., Lieberman, J., *et al.* (2007a). let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell* 131, 1109–1123.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007b). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2009). Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science* 324, 797–801.
- Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C., and Dailey, L. (1995). Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev.* 9, 2635–2645.
- Yuan, P., Han, J., Guo, G., Orlov, Y.L., Huss, M., Loh, Y.-H., Yaw, L.-P., Robson, P., Lim, B., and Ng, H.-H. (2009). Eset partners with Oct4 to restrict extraembryonic trophoblast lineage potential in embryonic stem cells. *Genes Dev.* 23, 2507–2520.
- Yusa, K. (2015). piggyBac Transposon. *Microbiol. Spectr.* 3.
- Yusa, K., Rad, R., Takeda, J., and Bradley, A. (2009). Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat. Methods* 6, 363–369.
- Zhang, H., Ma, Y., Gu, J., Liao, B., Li, J., Wong, J., and Jin, Y. (2012a). Reprogramming of somatic cells via TAT-mediated protein transduction of recombinant factors. *Biomaterials* 33, 5047–5055.
- Zhang, H., Ma, Y., Gu, J., Liao, B., Li, J., Wong, J., and Jin, Y. (2012b). Reprogramming of somatic cells via TAT-mediated protein transduction of recombinant factors. *Biomaterials* 33, 5047–5055.
- Zhang, Q., Zhong, J., Liang, X., Liu, W., and Huan, L. (2010). Improvement of human interferon alpha secretion by *Lactococcus lactis*. *Biotechnol. Lett.* 32, 1271–1277.
- Zhao, Q., Li, S., Yu, H., Xia, N., and Modis, Y. (2013). Virus-like particle-based human vaccines: quality assessment based on structural and functional properties. *Trends Biotechnol.* 31, 654–663.
- Zhao, T., Zhang, Z.-N., Rong, Z., and Xu, Y. (2011). Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 474, 212–215.
- Zhao, W., Hisamuddin, I.M., Nandan, M.O., Babbitt, B.A., Lamb, N.E., and Yang, V.W. (2004). Identification of Krüppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene* 23, 395–402.
- Zhao, X., Li, W., Lv, Z., Liu, L., Tong, M., Hai, T., Hao, J., Guo, C., Wang, X., Wang, L., *et al.* (2010). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells using an alternative culture medium. *Cell Res.* 20, 383–386.
- Zhou, W., and Freed, C.R. (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 2667–2674.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., *et al.* (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381–384.
- Zhu, H., Shyh-Chang, N., Segrè, A.V., Shinoda, G., Shah, S.P., Einhorn, W.S., Takeuchi, A., Engreitz, J.M., Hagan, J.P., Kharas, M.G., *et al.* (2011). The Lin28/let-7 Axis Regulates Glucose Metabolism. *Cell* 147, 81–94.

Zochowska, M., Paca, A., Schoehn, G., Andrieu, J.-P., Chroboczek, J., Dublet, B., and Szolajska, E. (2009). Adenovirus Dodecahedron, as a Drug Delivery Vector. *PLoS ONE* 4, e5569.

Zochowska, M., Piguet, A.-C., Jemielity, J., Kowalska, J., Szolajska, E., Dufour, J.-F., and Chroboczek, J. (2015). Virus-like particle-mediated intracellular delivery of mRNA cap analog with in vivo activity against hepatocellular carcinoma. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 11, 67–76.

Zulianello, L., Canard, C., Kohler, T., Caille, D., Lacroix, J.-S., and Meda, P. (2006). Rhamnolipids Are Virulence Factors That Promote Early Infiltration of Primary Human Airway Epithelia by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 74, 3134–3147.

Zwilling, S., König, H., and Wirth, T. (1995). High mobility group protein 2 functionally interacts with the POU domains of octamer transcription factors. *EMBO J.* 14, 1198–1208.

Summary

Like embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells (iPS) are characterized by their ability to differentiate into any cell type in an organism. However their use doesn't raise the ethical issue linked to the use of embryos. iPS are generated from somatic cells by overexpression of embryonic transcription factors. iPS are thereby very promising in fundamental and applied biology as well as for regenerative medicine.

Most of the protocols used to generate iPS are based on the delivery of nucleic acid sequences encoding embryonic transcription factors responsible for the activation of the pluripotency gene network. In spite of their efficiency, these methods are associated with major safety concerns incompatible with clinical applications. The more rational path to safely produce iPS is to deliver the exogenic transcription factors under their protein form. Recently some protocols using protein delivery have been developed to produce iPS. However associated efficiencies are very low and protocols are quite fastidious.

The aim of this Ph.D. project was to develop a new efficient and simplified protein delivery method for the safe generation of iPS compatible with clinical applications. Cell sources were selected depending of the final applications of iPS: (i) fibroblasts, extensively used and described in bibliography and allowing autologous therapies with many applications in the field of hematology; (ii) cord blood hematopoietic stem cells, one of the safest biomaterials, with the aim to generate red blood cells *in vitro* in order to respond to increasing needs for transfusion products, particularly for rare blood types.

First, different protein vectors developed by the TheREx team of the TIMC-IMAG laboratory were compared for their efficiency of production and delivery as well as for the activity of associated factors. The selected vector is a natural micro-syringe expressed by *Pseudomonas aeruginosa*, able to inject the transcription factors Oct4, Sox2, Nanog and Lin28a (Thomson combination) with c-Myc directly into the cytoplasm of target cells, without the need for any purification step. Once injected, transcription factors are addressed to the nucleus in less than 2 hours where they efficiently activate transcription of pluripotency genes, with significant responses observed as early as 24h after injection. We also highlighted the secured and controllable nature of this vector by completely eliminating the bacteria from the cultures in a few hours after injection with an antibiotic treatment. Optimizations of the reprogramming conditions were also made by adjusting many parameters such as the combination of transcription factors, the injection frequency and the bacteria: cell ratio.

Hence, even if we didn't succeed in generating iPS so far thanks to this system, this natural micro-syringe that we developed and optimized seems to be a new tool of choice for protein delivery in order to generate iPS in terms of efficiency of intracellular delivery and activation of gene expression, safety and ease of use.

Keywords: induced pluripotent stem cells (iPS), transcription factors, safe reprogramming, Type 3 secretion system, Pseudomonas aeruginosa, protein delivery systems.

Résumé

Les cellules souches pluripotentes induites (iPS) partagent avec les cellules souches embryonnaires la capacité à se différencier en tous les types cellulaires d'un organisme, mais leur obtention ne nécessite pas l'utilisation d'embryons. Elles sont générées par la surexpression de facteurs de transcription embryonnaires au sein de cellules somatiques. Les iPS représentent un outil de choix en biologie fondamentale et appliquée ainsi qu'en médecine régénérative.

La plupart des protocoles de génération d'iPS reposent sur un transfert des séquences nucléotidiques codant les facteurs de transcription embryonnaires impliqués dans la mise en place du réseau de pluripotence. Bien qu'efficaces, ces méthodes présentent des problèmes de sécurité majeurs, incompatibles avec une utilisation clinique des iPS générées. La voie la plus rationnelle pour produire des iPS de manière parfaitement sécurisée est d'apporter les facteurs exogènes directement sous leur forme protéique. Des protocoles de reprogrammation par transfert de protéines ont été récemment développés, mais les efficacités associées sont relativement faibles et les protocoles relativement fastidieux.

L'objectif de ce projet de thèse était de mettre au point une nouvelle approche de transfert de protéines, sécurisée et simplifiée, pour la génération de cellules souches pluripotentes induites utilisables en clinique. Les cellules à reprogrammer ont été choisies en fonction des applications potentielles des iPS générées : (i) les fibroblastes, faisant référence dans la bibliographie et permettant d'envisager des thérapies autologues avec notamment de nombreuses applications en hématologie ; (ii) les cellules souches hématopoïétiques de sang de cordon, l'un des matériaux biologiques les plus sûrs, afin de générer des globules rouges *in vitro*, dans la perspective de répondre aux demandes croissantes en terme de transfusion, en particulier pour les groupes sanguins rares.

Nous avons donc comparé les différents vecteurs de transduction de protéines développés par l'équipe TheREx du laboratoire TIMC-IMAG, en termes de facilité de production, d'efficacité de transfert ainsi que sur l'activité des facteurs de transcription associés. Le vecteur sélectionné est une micro-seringue naturelle portée par la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, capable d'injecter les facteurs Oct4, Sox2, Nanog et Lin28 (facteurs de Thomson) mais aussi c-Myc, directement dans le cytoplasme des cellules cibles, sans étape de purification nécessaire. Les facteurs de transcription injectés sont adressés jusqu'au noyau des cellules en moins de 2h, où ils activent rapidement la transcription des gènes de pluripotence, avec des réponses significatives mesurées dès 24h après injection. Nous avons également mis en évidence le caractère sécurisé et contrôlable du vecteur puisque nous sommes capables d'éliminer complètement les bactéries des cultures grâce à un traitement antibiotique, et ce dès quelques heures après l'injection. Des optimisations des conditions de reprogrammation ont été réalisées en modifiant les principaux paramètres que sont, le choix des facteurs de transcription, la fréquence des injections et le ratio bactéries : cellules.

Ainsi, bien que nous ne soyons pas parvenus à générer des iPS à ce jour avec ce système, la micro-seringue naturelle que nous avons développée et optimisée se positionne comme un vecteur de choix pour le transfert de protéines dans l'optique de générer des iPS, en termes d'efficacité de vectorisation et d'induction transcriptionnelle, de sécurité mais aussi de facilité d'utilisation.

Mots clés : cellules souches pluripotentes induites (iPS), facteurs de transcription, reprogrammation sécurisée, système de sécrétion de type III, Pseudomonas aeruginosa, vecteurs protéiques